

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

P/ INT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 16 October 2000 (16.10.00)	
International application No. PCT/KR00/00104	Applicant's or agent's file reference PC91143/HMY
International filing date (day/month/year) 11 February 2000 (11.02.00)	Priority date (day/month/year) 11 February 1999 (11.02.99)
Applicant HAN, Jae, Yong et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

06 September 2000 (06.09.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Juan Cruz
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Form PCT/IB/331 (July 1992)

KR0000104

BEST AVAILABLE COPY

[별지 제65호의48서식]

SUBMISSION OF CORRECTION

To : Commissioner of
the Korean Intellectual Property Office

International Application No.		PCT/KR00/00104	International Filing Date	11 February 2000 (11. 02. 2000)	Priority Date	11 February 1999 (11. 02. 1999)
Applicant	Name	HAN, Jae Yong et al	Residence Reg. No.		Country of Nationality	Republic of Korea
	Address	Dongbo Apt. 101-513, Yongin 3 cha, Suji, Yongin-city, Kyonggi-do 449-840, Republic of Korea				
Agent	Name	JANG Seong Ku KWON Young Mo	Agent's Code	9-1998-000514-8 9-1998-000066-6	Tel. No.	82-2-589-0001
	Address	17th Floor, KEC Building, #275-7, Yangjae-dong, Seocho-ku, Seoul 137-130, Republic of Korea				

- ☐ Submitted hereby is a correction pursuant to Article 106-33(2) of the Enforcement Regulations of the Patent Law.
- ☒ Submitted hereby is a correction pursuant to Article 106-36(3) of the Enforcement Regulations of the Patent Law.

Date(day/month/year) 11/07/2001

Applicant (Agent) JANG Seong Ku (Seal)

KWON Young Mo (Seal)

※ Attached Document(s) :

1. Two copies of written amendments
2. A copy of the document(s) substantiating the power of attorney, if any

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PC91143/HMY	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/KR00/00104	Intrenational filing date (day/month/year) 11 FEBRUARY 2000 (11.02.2000)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 11 FEBRUARY 1999 (11.02.1999)
Applicant HAN, Jae Yong et al		

This International search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

- a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box II).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawing to be published with the abstract is Figure No. _____

☒ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☐ None of the figures.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**IPC7 C12N 5/00**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 C12N 5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

NCBI pubmed "primordial germ cells", IBM patent database

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Cell Biol Int, Aug 1997, Vol 21, No 8, pages 495-499	1-19
A	page 496, line 13- 26	20-23
	page 496, line 28-47	
X	Transgenic Res. Jul 1998, Vol 7, No 4, pages 247-252	24, 25
	page 248	
A	Mol Reprod Dev. Oct 1994, vol 39, No 2, pages 153-61	20-23
	page 154, 155	
A	Cell Biol Int, Jul 1995, Vol 19, No 7, pages 569-76	20-23
A	Proc Natl Acad Sci USA, Nov 1998, vol 95, No 23, pages 13726-31	1-19
	page 13726, 13727	
A	Nature, Oct 1991, vol 353, pages 750-752	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 APRIL 2000 (26.04.2000)

Date of mailing of the international search report

02 MAY 2000 (02.05.2000)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Industrial Property Office
Government Complex-Taejon, Dunsan-dong, So-ku, Taejon
Metropolitan City 302-701, Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

LIM, Hea Joon

Telephone No. 82-42-481-5610



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR00/00104

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Cell, Sept 1992, vol 70 pages 841-847 page 841	1-19
A	J Exp Zool, Feb 1998, vol 280, No 3, pages 265-7 page 266,	20-23
A	Biol Reprod, May 1998, vol 58, No 5, pages 1321-9	1-25
A	Biol Reprod, Nov 1998, vol 59, No 5, pages 1224-9 page 1224	1-19
A	US 5340740 A (James N. Petite) 23 Aug 1994 (23. 08. 94) page 3, column 2, line 15-59	1-19

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum)

PC91143/HMY

Box No. I TITLE OF INVENTION

AVIAN PLURIPOTENT EMBRYONIC GERM CELL LINE

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

HAN Jae Yong

Dongbo Apt. 101-513, Yongin 3 cha, Suji,
Yongin-city, Kyonggi-do 449-840, Republic of Korea

☒ This person is also inventor.

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:

KR

State (that is, country) of residence:

KR

This person is applicant for the purposes of:



all designated States



all designated States except the United States of America



the United States of America only



the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Hanmi Pharm. Co., Ltd.

#893-5, Hajeo-ri, Paltan-myeon, Hwaseong-gun,
Kyungki-do 445-910, Republic of Korea

This person is:

☒ applicant only

☐ applicant and inventor

☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

KR

State (that is, country) of residence:

KR

This person is applicant for the purposes of:



all designated States



all designated States except the United States of America



the United States of America only



the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:



agent



common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

JANG Seong Ku / KWON Young Mo

17th Fl., KEC Building, #275-7, Yangjae-dong,
Seocho-ku, Seoul 137-130, Republic of Korea

Telephone No.

82-2-589-0001

Facsimile No.

82-2-589-0002

E-mail Address

firstlaw@unitel.co.kr

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

PARK Tae Sub

Satbyeol Apt. 606-1106, Dalan-dong, Dongan-gu,
Anyang-shi, Kyonggi-do 431-058, Republic of Korea

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality: KR

State (that is, country) of residence: KR

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

☐ applicant only

☐ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

☐ applicant only

☐ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

☐ applicant only

☐ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No.V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☐ **AP** ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☐ **EA** Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP** European Patent: AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☐ **OA** OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> AE United Arab Emirates | <input type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input type="checkbox"/> AL Albania | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Armenia | <input type="checkbox"/> LT Lithuania |
| <input type="checkbox"/> AT Austria | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input type="checkbox"/> MA Morocco |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input type="checkbox"/> MD Republic of Moldova |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgaria | <input type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> BR Brazil | <input type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NO Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input type="checkbox"/> CR Costa Rica | <input type="checkbox"/> PL Poland |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input type="checkbox"/> RO Romania |
| <input type="checkbox"/> DE Germany | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> DK Denmark | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> DM Dominica | <input type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input type="checkbox"/> EE Estonia | <input type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input type="checkbox"/> ES Spain | <input type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input type="checkbox"/> FI Finland | <input type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GD Grenada | <input type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> GE Georgia | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input type="checkbox"/> HR Croatia | <input type="checkbox"/> TZ United Republic of Tanzania |
| <input type="checkbox"/> HU Hungary | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesia | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input type="checkbox"/> IN India | <input type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input type="checkbox"/> IS Iceland | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya | <input type="checkbox"/> ZA South Africa |
| <input type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KR Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |

Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

- ☐
- ☐

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM		<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.		
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 11 February 1999 (11. 02. 99)	1999-4860	KR		
item (2)				
item (3)				
<input type="checkbox"/> The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): _____				
<i>* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.</i>				
Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY				
Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used) :		Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority): Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)		
ISA / KR				
Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING				
This international application contains the following number of sheets: request : 4 description (excluding sequence listing part) : 17 claims : 3 abstract : 1 drawings : 5 sequence listing part of description : 2 Total number of sheets : 32		This international application is accompanied by the item(s) marked below: 1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet 2. <input checked="" type="checkbox"/> separate signed power of attorney 3. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: 4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature 5. <input checked="" type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): (1) 6. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language): 7. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material 8. <input checked="" type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form 9. <input type="checkbox"/> other (specify):		
Figure of the drawings which should accompany the abstract: Fig. 1a		Language of filing of the international application: English		
Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT				
Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).				
JANG Seong Ku (Seal)				
KWON Young Mo (Seal)				

For receiving Office use only		2. Drawings: <input type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received:
1. Date of actual receipt of the purported international application:		
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.	

For International Bureau use only
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary examining Authority or, if two or more Authorities are competent, with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:

IPEA/ KR

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:
The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty and hereby elects all eligible States(except where otherwise indicates).

For International Preliminary Examining Authority use only

Identification of IPEA		Date of receipt of DEMAND	
Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION		Applicant's or agent's file reference PC91143/HMY	
International application No. PCT/KR00/00104	International filing date(day/month/year) 11 February 2000 (11. 02. 00)	(earliest)Priority date(day/month/year) 11 February 1999 (11. 02. 99)	
Title of invention AVIAN PLURIPOTENT EMBRYONIC GERM CELL LINE			
Box No. II APPLICANT(S)			
Name and address:(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) HAN Jae Yong Dongbo Apt. 101-513, Yongin 3 cha, Suji, Yongin-city, Kyonggi-do 449-840, Republic of Korea		Telephone No.:	
		Facsimile No.:	
		Teleprint No.:	
State(that is, country)of nationality: KR		State(that is, country)of residence: KR	
Name and address:(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) Hanmi Pharm. Co., Ltd. #893-5, Hajeo-ri, Paltan-myeon, Hwaseong-gun, Kyungki-do 445-910, Republic of Korea			
State(that is, country)of nationality: KR		State(that is, country)of residence: KR	
Name and address:(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) PARK Tae Sub Satbyeol Apt. 606-1106, Dalan-dong, Dongan-gu, Anyang-shi, Kyonggi-do 431-058, Republic of Korea			
State(that is, country)of nationality: KR		State(that is, country)of residence: KR	
<input type="checkbox"/> Further applicants are indicated on a continuation sheet.			

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCEThe following person is ☒ agent ☐ common representativeand ☒ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination.☐ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked☐ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation.
The address must include postal code and name of country.)

JANG Seong Ku

17th Fl., KEC Building, #275-7, Yangjae-dong, Seocho-ku,

Seoul 137-130, Republic of Korea

Telephone No.:

82-2-589-0001

Facsimile No.:

82-2-589-0002

Teleprint No.:

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.**Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION****Statement concerning amendments: ***

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

☒ the international application as originally filedthe description ☐ as originally filed
☐ as amended under Article 34the claims ☐ as originally filed
☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)
☐ as amended under Article 34the drawings ☐ as originally filed
☐ as amended under Article 342. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.3. ☐ The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of 20 months from the priority date unless the International preliminary examining Authority receives a copy of any amendments made under Article 19 or a notice from the applicant that he does not wish to make such amendments (Rule 69.1(d)).
(This check-box may be marked only where the time limit under Article 19 has not yet expired.)

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, when a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International preliminary examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination: English☒ which is the language in which the international application was filed☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.☐ which is the language of publication of the international application.☐ which is the language of a translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination..**Box No. V ELECTION OF STATES**

The applicant hereby elects all eligible States (that is, all States which have been designated and which are bound by Chapter II of the PCT)

Excluding the following States which the applicant wishes not to elect:

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination:

- | | | |
|---|---|--------|
| 1. translation of international application | : | sheets |
| 2. amendments under Article 34 | : | sheets |
| 3. copy(or, where required, translation)of amendment under Article 19 | : | sheets |
| 4. copy(or, where required, translation)of Statement under Article 19 | : | sheets |
| 5. letter | : | sheets |
| 6. other(specify) | : | sheets |

For International Preliminary Examining Authority use only

received Not received

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

- | | |
|--|---|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet | 4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature |
| 2. <input type="checkbox"/> separate signed power of attorney | 5. <input type="checkbox"/> nucleotide and or amino acid sequence listing in computer readable form |
| 3. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: | 6. <input type="checkbox"/> other(specify): |

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of th person signing and the capacity in which the person sings(if such capacity is not obous from reading the demand).

JANG Seong Ku (인)

For International Preliminary Examining Authority use only

1. Date of actual receipt of DEMAND:

2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b)

3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply. ☐ The applicant has been informed accordingly.

4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the period of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5

5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the experation of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCLUDED pursuant to rule 82

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on:

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

JANG, Seong Ku

17th Fl., KEC Bldg., 275-7 Yangiac-dong, Seocho-gu, Seoul
137-070, Korea

PCT

WRITTEN OPINION

(PCT Rule 66)

Date of mailing (day/month/year) 09 JULY 2001 (09.07.2001)	
Applicant's or agent's file reference PC91143/HMY	REPLY DUE within 1 months from the above date of mailing
International application No. PCT/KR00/00104	International filing date (day/month/year) 11 FEBRUARY 2000 (11.02.2000)
Priority date(day/month/year) 11 FEBRUARY 1999 (11.02.1999)	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC IPC7 C12N 5/00	
Applicant HAN, Jae Yong et al	

1. This written opinion is the first (first,etc.) drawn by this International Preliminary Examining Authority.

2. This opinion contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the opinion
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application



3. The applicant is hereby invited to reply to this opinion.

When ? See the time limit indicated above. The applicant may, before the expiration of that time limit, request this Authority to grant an extension, see Rule 66.2(d)

How ? By submitting a written reply, accompanied, where appropriate, by amendments, according to Rule 66.3
For the form and the language of the amendments, see Rules 66.8 and 66.9

Also For an additional opportunity to submit amendments, see Rule 66.4
For an examiner's obligation to consider amendments and/or arguments, see Rule 66.4bis
For an informal communication with the examiner, see Rule 66.6

If no reply is filed, the international preliminary examination report will be established on the basis of this opinion.

4. The final date by which the international preliminary examination report must be established according to Rule 69.2 is: 01 JUNE 2001 (01.06.2001)

Name and mailing address of the IPEA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer LIM, Hea Joon Telephone No. 82-42-481-5590
--	---



WRITTEN OPINION

International application No.

PCT/KR00/00104

I. Basis of the opinion

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
the description: _____, as originally
pages _____, filed with the
demand _____
he claims: _____, as originally
pages _____
pages _____, as amended (together with any statement) under Article
19 _____
☐ the drawings: _____, as originally
pages _____, filed with the
demand _____
☐ the sequence listing part of the description: _____, as originally
pages _____, filed with the
demand _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which

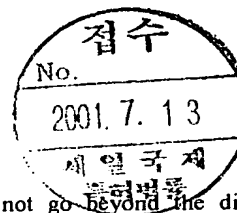
the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and/

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the written opinion was drawn on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in printed form.
☐ filed together with the international
☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form
☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.



4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
☐ the claims, Nos. _____
☐ the drawings, sheet/fig _____

5. ☐ This opinion has been drawn as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this opinion as "originally filed."

WRITTEN OPINION

International application No.

PCT/KR00/00104

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-19, 20-23, 24, 25	YES
	Claims	none	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-19, 20-23,	YES
	Claims	24, 25	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19, 20-23, 24, 25	YES
	Claims	none	NO

2. Citations and explanations

D1=Transgenic Res, Jul 1998, vol7, No 4, pp247-252

본원의 청구범위 제24항 내지 제25항은 확립된 EG세포 또는 원시생식세포내로 전기충격법(electroporation) 또는 리포솜을 이용하여 외래 유전자를 전이시키는 방법 및 전이된 EG 세포를 항생제가 첨가된 배지에서 계대 배양함으로써 안정적으로 외래 유전자가 전이된 세포만을 선발하는 방법에만 관한 발명이나 D1 문헌에 원시생식세포 내로 전기 충격법을 이용하여 외래 유전자를 도입하여 유전자 변이 닭을 생산하는 방법이 기재되어 있어 본원의 청구항을 상기 인용 문헌과 대비하면

1. 신규성

인정됨[PCT Article 33(2)]

2. 진보성

제24항 내지 제25항의 원시생식세포내로 전기 충격법 또는 리포솜을 이용하여 외래 유전자를 도입하는 방법 및 항생제가 첨가된 배지로 유전자 전이된 세포를 선발하는 방법은 D1 문헌에 의하여 진보성이 인정되지 아니함[PCT Article 33(3)]

3. 산업상 이용가능성

안정됨[PCT Article 33(4)]

Amendment to the Claims

Please replace originally filed page 20 with the enclosed new page 20, wherein claims 24 and 25 are amended.

- 20 -

differentiates and contributes to various tissues.

19. The avian EG cell line of claim 16, which is a chicken embryonic germ cell line having characteristics substantially identical to that deposited under the accession number of KCLRF-BP-00026.

20. A process for preparing a somatic or germline chimera comprising injecting the avian EG cell of claim 16 into an egg.

21. The process of claim 20, wherein the EG cell is injected into a germinal cavity or blood vessel of the egg.

22. The process of claim 21, wherein the EG cell is injected into the germinal cavity of the egg at a stage X.

23. The process of claim 21, wherein the EG cell is injected into the blood vessel of the egg at a stage ranging from 13 to 17.

24. A process for transfecting a foreign gene into EG cells characterized by using electroporation or liposome.

25. A process for selecting stably transfected EG cells comprising passaging EG cells transfected by a foreign gene in a medium containing an antibiotic.

AMENDED SHEET

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PC91143/HMY	FOR FURTHER ACTION		See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/KR00/00104	International filing date (day/month/year) 11 FEBRUARY 2000 (11.02.2000)	Priority date (day/month/year) 11 FEBRUARY 1999 (11.02.1999)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC IPC7 C12N 5/00			
Applicant HAN, Jae Yong et al			

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	<p>This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>1</u> sheets.</p>
3.	<p>This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application



Date of submission of the demand 06 SEPTEMBER 2000 (06.09.2000)	Date of completion of this report 16 JULY 2001 (16.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer LIM, Hea Joon Telephone No. 82-42-481-5590

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

international application No.

PCT/KR00/00104

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-17, 21 , as originally filed
 pages _____ , filed with the demand
 pages _____ , filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages 18,19 , as originally filed
 pages _____ , as amended (together with any statement) under Article 19
 pages _____ , filed with the demand
 pages 20 , filed with the letter of 2001. 7. 11.
- ☒ the drawings:
 pages 1/5 - 5/5 , as originally filed
 pages _____ , filed with the demand
 pages _____ , filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
 pages 1, 2 , as originally filed
 pages _____ , filed with the demand
 pages _____ , filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheet _____

5. ☐ This opinion has been drawn as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this opinion as "originally filed." and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item I and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION

International application No.

PCT/KR00/00104

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-19, 20-23, 24, 25	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-19, 20-23, 24, 25	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19, 20-23, 24, 25	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations (Rule 70.7)

1) The following document have been considered for the purpose of this report:

D1=Cell Biol Int, Aug 1997, Vol 21, No 8, pp495-499

D2=Transgenic Res., Jul 1998, vol 7, No 4, pp247-252

D3=Proc Natl Acad Sci USA, Nov 1998, vol 95, No 23, pp13726-31

2) Novelty

Claims 1-19, 20-23, 24, 25 relate to a process for preparing an established avian embryonic germ cell line.

Document D1 discloses primordial germ cell cultures, isolated from 5 day old chick embryonic germinal ridges, cultured in vitro for a further 5 days, shown proliferate on stroma cells derived from the germinal ridge.

Document D2 discloses a electroporation process for introducing foreign gene to PGCs, followed by culturing gonadal cells in medium with insulin-like growth factor-1, bFGF and LIFs before injecting into recipient.

Document D3 discloses a method of derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells.

Since claims 1-19, 20-23, 24, 25 discloses a process for preparing an established avian embryonic germ cell line, different from D1, D2 utilized the PGC cells cultured for 5 days, did not establish embryonic germ cell line, also different from D3 disclosed process for human PGC cells, those claims are considered to be novel.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/KR00/00104

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of:

box V

3) Inventive Step

Claims 1-19, 20-23, 24, 25 relate to a process for preparing an established avian embryonic germ cell line, more particularly comprising the steps of (a) culturing primordial germ cells (PGCs) isolated from an avian embryonic gonad in a medium supplemented with a cell growth factor and a differentiation inhibitory factor to obtain EG cell colonies; culturing the EG cells in the same medium as in step by employing a feeder layer until the EG are colonized and recovering and subculturing the EG cells in the same medium as in step to establish the EG cell line.

Document D1 discloses primordial germ cell cultures, isolated from 5 day old chick embryonic germinal ridges, cultured in vitro for a further 5 days, shown proliferate on stroma cells derived from the germinal ridge. To determine whether these cultured PGCs could colonize and contribute to the germ-line, PGCs were injected into the bloodstream of stage 17 chick embryos. The donor PGCs had migrated into the germinal ridges of the recipient embryos and colonize.

Document D2 discloses a electroporation process for introducing foreign gene to PGCs, followed by culturing gonadal cells in medium with insulin-like growth factor-1, bFGF and LIFs before injecting into recipient.

Major difference between two inventions lies in the establishment of embryonic germ cell line. This invention established totipotent embryonic germ cell lines, whereas D1 and D2 documents utilized the PGC cells cultured for 5 days.

Useful contribution of this invention is setting up the appropriate conditions for establishment of avian ES cell line, also different from conditions for human EG cells as described in D3 document. In this invention, it is crucial steps, culturing primordial germ cells (PGCs) isolated from an avian embryonic gonad in a medium supplemented with a cell growth factor and a differentiation inhibitory factor particularly IL-11, IGF-I to obtain EG cell colonies, whereas D1 discloses simple incubation of PGC cells for 5 days in a medium lacking IL-11 without colonization of PGC cells. It is advantageous step, finding particular conditions for establishment of ES cell line, the steps were as following, culturing primordial germ cells (PGCs) in a medium supplemented with a appropriate factor, particularly IL-11, IGF-I to obtain EG cell colonies, culturing the EG cells in the same medium as in step by employing a feeder layer until the EG are colonized and recovering and subculturing. This invention discloses EG cell colonies were maintained 10 passages, for 4 months. Additionally, the established ES cell line was tested and proven to be embryonic cell showing the characteristics of ES cell line such as the presence of glycogens and SSEA-1 epitope as well as.

Therefore, claims 1-19, 20-23, 24, 25 in this invention appear to involve an inventive step,

4) Industrial applicability

The subject matter of claims 1-19, 20-23, 24, 25 is considered to be industrially applicable.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

REC'D 24 JUL 2001

RECEIVED
WIPO MAY 31 2002
TECH CENTER 1600/2000

Applicant's or agent's file reference PC91143/HMY	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/KR00/00104	International filing date (day/month/year) 11 FEBRUARY 2000 (11.02.2000)	Priority date (day/month/year) 11 FEBRUARY 1999 (11.02.1999)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC IPC7 C12N 5/00		
Applicant HAN, Jae Yong et al		

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet. <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>1</u> sheets.
3.	This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 06 SEPTEMBER 2000 (06.09.2000)	Date of completion of this report 16 JULY 2001 (16.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer LIM, Hea Joon Telephone No. 82-42-481-5590

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/KR00/00104

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-17, 21 , as originally filed
pages _____ , filed with the demand
pages _____ , filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages 18,19 , as originally filed
pages _____ , as amended (together with any statement) under Article 19
pages _____ , filed with the demand
pages 20 , filed with the letter of 2001. 7. 11.
- ☒ the drawings:
pages 1/5 - 5/5 , as originally filed
pages _____ , filed with the demand
pages _____ , filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
pages 1, 2 , as originally filed
pages _____ , filed with the demand
pages _____ , filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheet _____

5. ☐ This opinion has been drawn as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this opinion as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item I and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION

International application No.

PCT/KR00/00104

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-19, 20-23, 24, 25	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-19, 20-23, 24, 25	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19, 20-23, 24, 25	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations (Rule 70.7)

1) The following document have been considered for the purpose of this report:

D1=Cell Biol Int. Aug 1997, Vol 21, No 8, pp495-499

D2=Transgenic Res., Jul 1998, vol 7, No 4, pp247-252

D3=Proc Natl Acad Sci USA, Nov 1998, vol 95, No 23, pp13726-31

2) Novelty

Claims 1-19, 20-23, 24, 25 relate to a process for preparing an established avian embryonic germ cell line.

Document D1 discloses primordial germ cell cultures, isolated from 5 day old chick embryonic germinal ridges, cultured in vitro for a further 5 days, shown proliferate on stroma cells derived from the germinal ridge.

Document D2 discloses a electroporation process for introducing foreign gene to PGCs, followed by culturing gonadal cells in medium with insulin-like growth factor-1, bFGF and LIFs before injecting into recipient.

Document D3 discloses a method of derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells.

Since claims 1-19, 20-23, 24, 25 discloses a process for preparing an established avian embryonic germ cell line, different from D1, D2 utilized the PGC cells cultured for 5 days, did not establish embryonic germ cell line, also different from D3 disclosed process for human PGC cells, those claims are considered to be novel.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/KR00/00104

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of:

box V

3) Inventive Step

Claims 1-19, 20-23, 24, 25 relate to a process for preparing an established avian embryonic germ cell line, more particularly comprising the steps of (a) culturing primordial germ cells (PGCs) isolated from an avian embryonic gonad in a medium supplemented with a cell growth factor and a differentiation inhibitory factor to obtain EG cell colonies; culturing the EG cells in the same medium as in step by employing a feeder layer until the EG are colonized and recovering and subculturing the EG cells in the same medium as in step to establish the EG cell line.

Document D1 discloses primordial germ cell cultures, isolated from 5 day old chick embryonic germinal ridges, cultured in vitro for a further 5 days, shown proliferate on stroma cells derived from the germinal ridge. To determine whether these cultured PGCs could colonize and contribute to the germ-line, PGCs were injected into the bloodstream of stage 17 chick embryos. The donor PGCs had migrated into the germinal ridges of the recipient embryos and colonize.

Document D2 discloses a electroporation process for introducing foreign gene to PGCs, followed by culturing gonadal cells in medium with insulin-like growth factor-1, bFGF and LIFs before injecting into recipient.

Major difference between two inventions lies in the establishment of embryonic germ cell line. This invention established totipotent embryonic germ cell lines, whereas D1 and D2 documents utilized the PGC cells cultured for 5 days.

Useful contribution of this invention is setting up the appropriate conditions for establishment of avian ES cell line, also different from conditions for human EG cells as described in D3 document. In this invention, it is crucial steps, culturing primordial germ cells (PGCs) isolated from an avian embryonic gonad in a medium supplemented with a cell growth factor and a differentiation inhibitory factor particularly IL-11, IGF-I to obtain EG cell colonies, whereas D1 discloses simple incubation of PGC cells for 5 days in a medium lacking IL-11 without colonization of PGC cells. It is advantageous step, finding particular conditions for establishment of ES cell line, the steps were as following, culturing primordial germ cells (PGCs) in a medium supplemented with a appropriate factor, particularly IL-11, IGF-I to obtain EG cell colonies, culturing the EG cells in the same medium as in step by employing a feeder layer until the EG are colonized and recovering and subculturing. This invention discloses EG cell colonies were maintained 10 passages, for 4 months. Additionally, the established ES cell line was tested and proven to be embryonic cell showing the characteristics of ES cell line such as the presence of glycogens and SSEA-1 epitope as well as.

Therefore, claims 1-19, 20-23, 24, 25 in this invention appear to involve an inventive step,

4) Industrial applicability

The subject matter of claims 1-19, 20-23, 24, 25 is considered to be industrially applicable.

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁷ : C12N 5/00	A1	(11) International Publication Number: WO 00/47717 (43) International Publication Date: 17 August 2000 (17.08.00)
(21) International Application Number: PCT/KR00/00104 (22) International Filing Date: 11 February 2000 (11.02.00) (30) Priority Data: 1999/4860 11 February 1999 (11.02.99) KR (71) Applicant (for all designated States except US): HANMI PHARM. CO., LTD. [KR/KR]; #893-5, Hajeo-ri, Pal-tan-myeon, Hwaseong-gun, Kyungki-do 445-910 (KR). (71)(72) Applicant and Inventor: HAN, Jae, Yong [KR/KR]; Dongbo Apt. 101-513, Yongin 3 cha, Suji, Yongin-city, Kyonggi-do 449-840 (KR). (72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant (for US only): PARK, Tae, Sub [KR/KR]; Satbyeol Apt. 606-1106, Dalan-dong, Dongan-gu, Anyang-shi, Kyonggi-do 431-058 (KR). (74) Agents: JANG, Seong, Ku et al.; KEC Building, 17th Floor, #275-7, Yangjae-dong, Seocho-ku, Seoul 137-130 (KR).		(81) Designated States: AU, CA, CN, JP, RU, US, European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Published <i>With international search report.</i>
(54) Title: AVIAN PLURIPOTENT EMBRYONIC GERM CELL LINE (57) Abstract Disclosed in this invention is a process for preparing an established avian embryonic germ cell line comprising the steps of: (a) culturing primordial germ cells (PGCs) isolated from an avian embryonic gonad in a medium supplemented with a cell growth factor and a differentiation inhibitory factor to obtain EG cell colonies; (b) culturing the EG cells in the same medium as in step (a) by employing a feeder layer until the EG cells are colonized; and (c) recovering and subculturing the EG cells in the same medium as in step (a) to establish the EG cell line.		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece			TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	ML	Mali	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MN	Mongolia	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MW	Malawi	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	MX	Mexico	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NO	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	NZ	New Zealand		
CM	Cameroon			PL	Poland		
CN	China	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
DE	Germany	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapore		

- 1 -

AVIAN PLURIPOTENT EMBRYONIC GERM CELL LINE

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates to a process for preparing an established avian pluripotent embryonic germ cell line and an avian pluripotent embryonic germ cell line.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10

Embryonic stem (ES) cell lines are undifferentiated and pluripotent cells isolated from blastocyst or morula embryos. Although ES cells are expected to be highly useful, e.g., in the study of developmental biology, analysis of the characteristics of totipotent cells, and gene-targeting to produce genetically modified livestock, only mouse ES cells with proven germ-line transmission have been established (Evans, M. J. and Kaufman, M. H., Nature, 292, 154-156(1981); Bradley et al., Nature, 309, 255-256(1984)) and the use of ES cells in producing livestock has not yet become a reality because of limitations in germ-line transmission in species other than mice (First, N. L. et al., Reprod. Feril. Dev., 6, 553-562(1994); wheeler, M. B., Reprod. Fertil. Dev., 6, 563-568(1994); Giles, J. R. et al., Mol. Reprod. Dev., 36, 130-138(1993); and Doetschman, T. C. et al., Dev. Biol., 127, 224-227(1988)).

Recently, primordial germ cells (PGCs), which are the progenitors of sperm or egg cells that develop after sexual maturity, have been provided as an alternative source of pluripotent stem cells. The stem cells derived from PGCs are called embryonic germ (EG) cells (Resnick, J. L. et al., Nature, 359, 550-551(1992); and Matsui, Y. et al., Cell, 70, 841-847(1992)). Mouse PGCs have been successfully co-cultured on mitotically inactivated STO cells supplemented with three critical growth factors: stem cell factor (SCF), leukemia inhibitory factor (LIF), and basic fibroblast growth factor (bFGF) (Godin, J. R. et al., Mol.

- 2 -

Reprod. Dev., 36, 130-138(1991); Dolci, S. et al., Nature, 352, 809-811(1991); Matsui, Y. et al., Nature, 353, 750-752(1991); and Resnick, J. L. et al., Nature, 359, 550-551(1992)). Resnick et al. reported that mouse PGCs
5 continued to proliferate after subculture and formed colonies of cells that resembled ES cells (Resnick, J. L. et al., Nature, 359, 550-551(1992)). Labosky et al. demonstrated that murine EG cell lines had the pluripotency needed for germ-line transmission in vivo (Labosky, P. A. et
10 al., Development, 120, 3197-3204(1994)).

As to bovine and porcine EG cells, there have been characterized traits such as morphology, alkaline phosphatase activity, and embryoid body formation (Cherny, R. A. et al., Reprod. Fertil. Dev., 6, 569-575(1994); Shim,
15 H. et al., Biol. Reprod., 57, 1189-1095(1997); Piedrahita, J. A. et al., J. Reprod. Fertil., 52, 245-254(1997)). However, germ-line transmission has not been proven in these species.

Pain et al. reported that avian stem cells with
20 multiple morphogenetic potentialities were derived and maintained in vitro by long-term culture of blastodermal cells. However, the production of pluripotent EG cells derived from PGCs has not previously been reported in any non-mammalian species.

25 In avian species, PGCs first arise from the epiblast and migrate to the hypoblast of the area pellucida (the germinal crescent) at stage 4, approximately 18-19 hours after incubation (Swift, C. H., Am. J. Anat., 15, 483-516(1914); Hamburger, V. and Hamilton, H. L., J. Morphol.,
30 88, 49-92(1951); and Eyal-Giladi, H. and Kochav, S., Dev. Biol., 49, 321-337(1976)). PGCs move from the germinal crescent into the blood stream at stage 10-12 (Ando, Y. and Fujimoto, T., Dev. Growth Differ., 25, 345-32(1983); and Ukeshima, A. et al., J. Electron. Microsc., 40, 124-
35 128(1991)) and circulate in the vascular system until stage 17 (2.5 days of incubation) when they reach the region of the germinal ridges, in which they finally concentrate and

- 3 -

colonize (Nieuwkoop, P. D. and Sutasurya, L. A., In Primordial Germ Cells in the Chordates, 113-127(1979)). This migration pathway and the subsequent developmental processes differ dramatically from the comparable processes in mammalian species.

Allioli et al. reported that chicken PGCs isolated from gonads could proliferate for several days under an in vitro culture condition (Allioli, N. et al., Dev. Biol., 165, 30-37(1994)). Chang et al. cultured chicken PGCs from gonads on stroma cells of the germinal ridge for 5 days (Chang, I. et al., Cell Biol. Int., 19, 569-676(1995)). These cultured gonadal PGCs had the ability to migrate to the germinal ridge when re-injected into recipient embryos. Recently, Chang et al. produced germ-line chimeric chickens by injection of gonadal PGCs which had been cultured in vitro for 5 days (Chang, I. et al., Cell Biol. Int., 21, 495-499(1997)).

Further, PCT publication No. WO 99/06534 discloses a method for establishing EG cells by culturing PGCs isolated from the blood of an embryo at stage 13 to 14 in a medium supplemented with LIF, bFGF, SCF and IGF-I without using a feeder layer. However, the amount of blood PGCs obtainable from an embryo, i.e., about 100 cells/embryo, is much less than that of gPGCs, i.e., more than 1000 cells/embryo, and it is difficult to isolate the blood PGCs from the embryonic blood. Further, although the PGCs were cultured without using a feeder layer, they attached to the wall of the culture vessel and morphologically changed only after 3 or 4 passages. Accordingly, it is presumed that the EG cells established therefrom would be already differentiated. Moreover, the EG cells were examined only on their alkaline phosphatase activity for the demonstration of the pluripotency thereof without examination on other properties and, accordingly, it is not certain whether the EG cells are indeed established. In addition, the reference did not teach or anticipate whether the EG cells have the in vitro and in vivo differentiating abilities, which are characteristics of

- 4 -

an established EG cells, and whether they proliferate continuously after several passages.

Thus, there has continued to exist a need to develop an EG cell line transmitting foreign gene through multiple generations, thereby enabling the production of a transgenic livestock using foreign gene transfection and gene targeting.

SUMMARY OF THE INVENTION

10

Accordingly, it is an object of the present invention to provide a process for establishing an avian pluripotent embryonic germ (EG) cell line.

Another object of the present invention is to provide an avian pluripotent embryonic germ cell line.

In accordance with one aspect of the present invention, there is provided a process for preparing an established avian embryonic germ cell line comprising the steps of:

(a) culturing primordial germ cells (PGCs) isolated from an avian embryonic gonad in a medium supplemented with a cell growth factor and a differentiation inhibitory factor to obtain EG cell colonies;

(b) culturing the EG cells in the same medium as in step (a) by employing a feeder layer until the EG cells are colonized; and

(c) recovering and subculturing the EG cells in the same medium as in step (a) to establish the EG cell line.

In accordance with another aspect of the present invention, there is provided a chicken embryonic germ cell line having characteristics substantially identical to that deposited under the accession number of KCLRF-BP-00026.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING

35

The above and other objects and features of the present invention will become apparent from the following description of the invention, when taken in conjunction with

- 5 -

the accompanying drawing, in which:

Figs. 1a and 1b show the morphological characteristics of chicken EG cell colonies after 3 passages on chicken embryonic fibroblast (Fig. 1a: scale, 50 μ m; and Fig. 1b: scale, 25 μ m);

Fig. 2 presents the PAS reactivity in EG cell colonies formed after 4 passages;

Fig. 3 presents the anti-SSEA-1 antibody screening results in EG cell colonies formed after 4 passages;

Fig. 4 presents the proliferation assay result in EG cell colonies stained after 8 passages;

Fig. 5a displays the embryoid bodies formed from a chicken EG cells in suspension culture after 8 days; and Figs. 5b to 5d, the results of immunohistochemical analyses of the embryoid bodies using antibodies against actin, α -1-fetoprotein and S100, respectively;

Fig. 6a exhibits typical Korean Ogol chickens having black feather; and Fig. 6b shows a somatic chimera chicken having white patches around the neck and on the breast; and

Fig. 7 depicts the result of PCR analysis for somatic and germline chimerisms.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The process of the present invention for establishing an avian embryonic germ (EG) cell line begins with the isolation of avian primordial germ cells (PGCs). The avian may be turkey, chicken, quail, pheasant or duck. The PGCs may be isolated from the embryonic gonad of an early-stage avian embryo, at stage 14 to 36 (50 hours to 10 days after incubation), preferably, stage 24 to 30 (4 to 6.5 days after incubation). For instance, the embryonic gonad of White Leghorn at stage 28 is isolated and then the gonad tissue is dissociated in trypsin-EDTA to obtain a suspension containing gonadal primordial germ cells (gPGC). However, the developmental stage of the embryo is not limitative unless it impairs the purpose of the present invention, and

- 6 -

may vary according to the avian species or the kind of organ, tissue and membrane from which the PGCs are separated.

The isolated PGCs are cultured at a temperature ranging
5 from 37 °C to 42 °C under an atmosphere containing 5% CO₂ in
a medium containing cell growth factors and a
differentiation inhibitory factor until the colonization of
EG cells. The medium is preferably DMEM (Dulbecco's
Modified Eagle's Medium; Gibco BRL cat#, 10313-021) or a
10 functional equivalent thereof.

Exemplary cell growth factors useful in the present
invention include stem cell factor (SCF), basic fibroblast
growth factor (bFGF), interleukin-11 (IL-11), insulin-like
growth factor-I (IGF-I) and a mixture thereof.
15 Representative differentiation inhibitory factor is leukemia
inhibitory factor (LIF). The culture medium may further
contain mammalian serum, avian serum or a supplementary
ingredient selected from the group consisting of sodium
pyruvate, glutamine, β -mercaptoethanol and a mixture
20 thereof.

The culture medium is preferably DMEM supplemented with
0.1 to 30% fetal bovine serum (FBS), 0.02 to 20 % chicken
serum, 0.01 to 100 mM sodium pyruvate, 0.02 to 200 mM
glutamine, 0.55 to 5500 μ M β -mercaptoethanol, 0.05 to 500
25 ng/ml of SCF, 0.1 to 1000 units/ml of LIF, 0.1 to 1000 ng/ml
of bFGF, 0.0004 to 4 ng/ml of IL-11 and 0.1 to 1000 ng/ml of
IGF-1.

The EG cell colonies formed on the medium is separated
into individual EG cell, e.g., by repeated pipetting, and
30 the EG cells are recovered, suspended in a medium, e.g., the
medium described above, and then cultured at 37 to 42 °C for
7 to 10 days on a feeder layer until the colonization of
cells exhibiting the morphological characteristics of an EG
cell line. As the feeder layer, avian embryonic fibroblast
35 or an equivalent thereof may be employed, while mitotically
active avian embryonic fibroblast (CEF) or avian fibroblast
is most preferred.

- 7 -

The resulting EG cells are passaged at an interval of 7 to 10 days in the same medium as above to establish an embryonic germ cell line. The embryonic germ cell line thus established may be maintained for a period of over 4 months by repeated subculture.

The present invention also provides a chicken EG cell line produced by using the inventive process.

The morphology of the chicken EG cell line colonies is multi-layered and the colonies are well-delineated. Each chicken EG cell is composed of a large nucleus and a relatively small amount of cytoplasm, similar to the separated morphologies of murine and porcine ES cells and EG cells (Wobus, A. M. et al., Exp. Cell. Res., 152, 212-2199(1984); Matsui, Y. et al., Cell, 70, 841-847(1992); Resnick, J. L. et al., Nature, 359, 550-551(1992); Shim, H. et al., Biol. Reprod., 57, 1089-1095(1997); and, Piedrahita, J. A. et al., Biol. Reprod., 58, 1321-1329(1998)). However, the morphology of the chicken EG cells is slightly different from that of mouse ES or EG cells in that almost all of the colonies are uniformly round and that the prominent dark nucleoli observed in other species are not clearly discernible. Avian species are different from mammalian species in terms of physiology, development and differentiation of germ cells and, thus, the chicken EG cells are different from mouse EG cells in their shape, their adhesive properties, and other characteristics.

The chicken EG cells maintain the characteristics of gonadal PGCs and undifferentiated stem cells. The chicken EG cells express SSEA-1 antigen and, in an in vitro suspension culture, successfully develop into embryoid bodies which differentiate into a variety of cell types. Further, the chicken EG cells are confirmed to proliferate and differentiate into various tissues including the gonad during embryo development in an experiment using chickens and, thus, they are pluripotent in vivo.

One of the chicken embryonic germ cell lines established in the present invention was deposited on

- 8 -

September 22, 1999 with the Korean Cell Line Research Foundation(KCLRF) (Address: Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, #28, Yongon-dong, Chongno-gu, Seoul, 110-744, Republic of Korea) under the
5 terms of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganism for the Purpose of Patent Procedure under the accession number of KCLRF-BP-00026.

A somatic or germline chimera can be produced by
10 microinjection of EG cells into an egg, preferably, into the germinal cavity or blood vessel thereof. More preferably, the EG cell may be microinjected into the germinal cavity of an egg at stage X or into the blood vessel of an egg at stage ranging from 13 to 17.

15 A desired foreign gene can be transfected and introduced in the inventive chicken EG cells by electroporation or liposome, and stably-transfected chicken EG cells can be selected by passaging them in a medium containing an antibiotic.

20 Thus, the inventive chicken EG cell lines are useful for the production of transgenic chickens and for studies of germ cell differentiation and genomic imprinting.

The following Examples are intended to further illustrate the present invention without limiting its scope.

25 Further, percentages given below for solid in solid mixture, liquid in liquid, and solid in liquid are on a wt/wt, vol/vol and wt/vol basis, respectively, unless specifically indicated otherwise.

30 Example 1 : Isolation of PGCs and establishment of culture condition for preparing a chicken EG cell line

(Step 1) Isolation of PGCs

A fertilized egg of White Leghorn obtained from the
35 College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University was incubated for 5.5 days (until stage 28) at 37.5 °C and a relative humidity of 60-70%. The embryo was

- 9 -

extracted from the fertilized egg at stage 28 and washed in a 100 mm petri dish with magnesium-free phosphate buffered saline (PBS) to remove the yolk and blood. The embryo was transferred to a petri dish coated with a black wax and the embryonic gonads were isolated therefrom with forceps. The gonad tissue was separated into individual gonadal primordial germ cells (gPGCs) by treating with 0.25% trypsin-0.05% EDTA. Added thereto was DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL, USA) containing 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco, USA) to inactivate trypsin-EDTA, and gPGCs were harvested by centrifugation.

(Step 2) Establishment of culture condition

The EG (embryonic germ) cell culture medium (i.e., DMEM) was supplemented with one or more of growth factors selected from stem cell factor (SCF), leukemia inhibitory factor (LIF), and basic fibroblast growth factor (bFGF). SCF, LIF, and bFGF have been reported to be important growth factors for the survival and proliferation of PGCs in the mouse (Resnick, J. L. et al., Nature, 359, 550-551(1992); and Donovan, P. J., Curr. Top. Dev. Biol., 29, 189-225(1994)). In addition to these three factors, growth-related factors such as interleukin-11 (IL-11) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) were added to the medium. The gPGCs obtained in Step 1 were suspended in the culture medium supplemented with various combinations of the above factors and then incubated at 37 °C under an atmosphere containing 5% CO₂ until the colonization of the EG cells.

Tests showed that colonization of EG cells does not occur in the absence of IL-11 and IGF-I. Therefore, IL-11 and IGF-I are essential for the survival and proliferation of chicken EG cells.

Example 2 : Culture of chicken EG cells

The EG cells obtained in Example 1 were seeded in a 24-

- 10 -

well culture plate containing EG cell culture media consisting of DMEM (Gibco, USA) supplemented with 10% FBS, 2% chicken serum (Gibco, USA), 1mM sodium pyruvate, 2mM L-glutamine, 5.5×10^{-5} M β -mercaptoethanol, 100 μ g/ml of streptomycin, 100 units/ml of penicillin, 5 ng/ml of human stem cell factor (hSCF; Sigma, USA), 10 units/ml of murine leukemia inhibitory factor (mLIF; Sigma, USA), 10 ng/ml of bovine basic fibroblast growth factor (bFGF; Sigma, USA), 0.04 ng/ml of human interleukin-11 (h-IL-11; Sigma, USA) and 10 ng/ml of human insulin-like growth factor-I (IGF-I; Sigma, USA) and incubated in an incubator for 7-10 days at 37°C under an atmosphere of 5% CO₂ to produce EG cell colonies deposited on a layer of germinal ridge stroma cells (GRSC). The colonies of chicken EG cells were separated from the GRSC layer by gentle pipetting and harvested by centrifuge at 200 X g for 5 minutes. The harvested EG cells were suspended in DMEM and divided into a fresh 24-well plate together with chicken embryonic fibroblasts (CEFs) which were not mitotically inactivated. The EG cell colonies were passaged at an interval of 7 to 10 days under the condition as above. These colonies were maintained for up to 10 passages and proliferated over a period of 4 months in repeated subculture.

Figs. 1a and 1b show chicken EG cell colonies after 3 passages on chicken embryonic fibroblast (CEF) cells (Fig. 1a: scale, 50 μ m; and Fig. 1b: scale, 25 μ m). The morphology of the chicken EG cells was slightly different from that of mouse ES or EG cells. Almost all of the chicken EG cell colonies were uniformly round and were not tightly bound to the CEF feeder layer. In contrast to mouse ES or EG cells, chicken EG cells did not pack strongly together and; it was not difficult to discern the individual component cells. The morphology of the colonies was multi-layered and the boundaries thereof was well-delineated. The chicken EG cell was composed of a large nucleus and a relatively small amount of cytoplasm, while its nucleoli was not prominent.

- 11 -

Example 3: Characterization of the EG cell

To determine whether the pluripotency of the EG cell possessed characteristic features of a pluripotent cell, the presence of glycogens and SSEA-1 epitope as well as its alkaline phosphatase activity and abilities to proliferate and differentiate in vitro were examined.

(1) Periodic Acid-Shiff's (PAS) staining

10

The EG cell colonies after 4 passages obtained in Example 2 were fixed to a plate in a 1 % glutaraldehyde solution for 5 min. and washed twice with an equal volume of phosphate buffered saline(PBS). The EG cell colonies were immersed in Periodic Acid Solution(Sigma, USA) at room temperature for 5 min. and then washed with an equal volume of PBS. The EG cell colonies were then immersed in Shiff's Solution(Sigma, USA) at room temperature for 15 min. and then washed twice with an equal volume of PBS. The resulting EG cell colonies were observed under an inverted microscope. Chicken PGCs can be easily identified by the PAS reaction which stains glycogens in the cytoplasm (Meyer, D. B., Dev. Biol., 10, 154-190(1964)). As can be seen in Fig. 2, the EG cells after 4 passages can be stained by PAS, although the staining is relatively weak.

(2) Anti-SSEA-1 antibody screening

The SSEA-1 epitope is characteristic of undifferentiated murine ES cells and has been as a criterion for distinguishing pluripotent stem cells (Solter, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 5565-5596 (1978)). To determine whether the pluripotency of the EG cell possessed characteristic features of a pluripotent cell, the presence of SSEA-1 epitope were examined.

The EG cell colonies after 4 passages obtained in Example 2 were fixed to a plate in 1 % glutaraldehyde

- 12 -

solution for 5 min. and washed twice with an equal volume of PBS. An ascites fluid of anti-SSEA-1 monoclonal antibody (MC-480; Solter, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 5565-5596 (1978)) was purchased from the Development Studies
5 Hybridoma Bank, Iowa University U.S.A., diluted 1,000 fold with PBS, and added to the EG cell colonies. The resulting EG cell colonies were reacted with avidin/biotin-conjugated alkaline phosphatase (Vector Lab., USA) and then with
10 BCIP/NBT alkaline phosphatase substrate (BCIP/NBT alkaline phosphatase substrate kit IV, Vector Lab., USA). The reaction was stopped by adding 10 mM EDTA(pH 8.0) thereto.

As can be seen in Fig. 3, all EG cells after 4 passages are positive toward SSEA-1 staining showing that the SSEA-1 epitope is expressed by the chicken EG cells.

15

(3) Proliferation assay

The EG cell colonies after 8 passages obtained in Example 2 were kept in solution containing bromodeoxyuridine
20 (BrdU, a thymidine analog), at 37 °C for 1 hour and washed twice with an equal volume of PBS. The resulting EG cell colonies were stained by cell proliferation assay kit (Amersham, UK) and then counterstained with PAS by repeating the procedure of (1). EG cell colonies containing
25 incorporated BrdU were detected using any anti-BrdU monoclonal antibody and a peroxidase/DAB system (Amersham, UK).

Fig. 4 presents the proliferation assay result of EG cell colonies stained after 8 passages. As can be seen from
30 Fig. 4, the EG cells after 8 passages are in continuous proliferation.

(4) Alkaline phosphatase activity assay

35 The alkaline phosphatase activity of the EG cell colonies after 4 passages obtained in Example 2 was measured using alkaline phosphatase substrate kit IV(Vector Lab.,

- 13 -

USA).

The result shows that the EG cells have scarcely alkaline phosphatase activity and did not regain the activity during subculture.

5 According to Swartz, W. J., Anat. Rec., 202, 379-385 (1982), alkaline phosphatase activity of avian PGCs is observably as early as 2 days of incubation but not after the entry of PGCs into genital ridge, which would suggest that the alkaline phosphatase activity of gonadal PGCs as
10 well as EG cells passaged therefrom would indeed be very weak.

(5) In vitro differentiation and immunohistochemical analysis

15

To examine whether embryoid bodies could formed from the chicken EG cells, the EG cell colonies after 4 passages obtained in Example 2 were gently agitated and centrifuged to obtain individually separated EG cells. The EG cells
20 were suspended in EG cell culture media free from mLIF and then placed in a non-adhesive bacteriological petri dish. The media was changed every other day for 8 days and the morphology of the cells was monitored daily.

Fig. 5a displays the embryoid bodies formed from
25 chicken EG cells in suspension after 8 days.

The embryoid bodies thus formed were collected and then distributed into a 96-well plate further to attach thereto and differentiate. The resulting cells were subjected to immunohistochemical analysis using antibodies for muscle-specific actin (Dako, USA), endoderm-specific α -1-
30 fectoprotein (Dako, USA) and ectoderm-specific S100 (Dako, USA), together with an DAKO LSAB kit and avidin/biotin-conjugated peroxidase system(Dako, USA).

Figs. 5b to 5d illustrate the results of
35 immunohistochemical analyses of the embryoid bodies using antibodies against actin, α -1-fectoprotein and S100, respectively. As can be seen from Figs. 5b to 5d, the EG

- 14 -

cells are capable of differentiating in vitro into a variety of cell types, e.g., endoderm, mesoderm and ectoderm lineage.

5 Example 4: Production of Chimeric Chicken

Korean Ogol chicken embryos at stage X or 13 to 17 (Eyal-Giladi, H. et al., Dev Biol, 49, 321-337(1976)) were used as recipients. The lateral part or pointed end of each
10 Korean Ogol chicken egg was punctured to provide a small window and then the shell membrane was removed.

The EG cells after 3 or 4 passages obtained in Example 2 were suspended in EG cell culture media at a concentration of 10^3 cells/ μ l and then 2 μ l of the suspension was injected
15 into the germinal cavity or blood vessel of the egg using a micropipette. Eggs injected with CEF were used as a control. The window of each egg was sealed twice with paraffin film, and then, the eggs were laid down with the pointed end at the bottom until hatching. The hatched
20 chicks were allowed to grow for 3 months to obtain somatic chimera chickens.

Of 45 eggs with manipulated embryos, 8 eggs were hatched and, among the eight, 3 chicks (37.5 %) were externally chimeric. Among chimeric chicks, two white
25 patched chicks were hatched from the embryos injected with the EG cells of 3 passages and one was from the embryo injected with the EG cells of 4 passages. The extent of white patching varied significantly among the 3 chicks. No white feather was observed with the control chick.

30 Fig. 6a exhibit, a pair of typical Korean Ogol chicken having black feathers; and Fig. 6b, the somatic chimera chicken having white patches around the neck and on the breast. The feather color of a White Leghorn is white due to the dominant pigmentation inhibitory gene(I/I), and a
35 Korean Ogol chicken, black due to the recessive pigment gene(i/i). Accordingly, the above result suggests that the EG cells of the White Leghorn are capable of differentiating

- 15 -

in vivo in the recipient Korean Ogol chicken embryo and, therefore, the EG cells are pluripotent in vivo. To verify the somatic chimerism of the chicken, genomic DNA samples were obtained by phenol extraction from the muscle, heart, liver and gonad of 5 chicks which died during hatching and then subjected to PCR analysis using White Leghorn-specific SCAR (sequence characterized amplified region) primers having nucleotide sequences of SEQ ID NO: 1 (forward primer) and SEQ ID NO: 2 (reverse primer).

10 PCR reactions were carried out at a 25 μ l scale using 50 to 100 ng of genomic DNA, 0.2 mM of each dNTP, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.4 pmol of forward primer, 0.4 pmol of reverse primer and 1 unit of Taq polymerase. The PCR program consisted of 1 minute of denaturation at 94 °C, 1 minute of annealing at 60 °C and 2 minutes of extension at 72 °C for 45 cycles in a DNA thermocycler (Perkin Elmer Cetus). The White Leghorn specific DNA fragment produced was approximately 3 kb. Fig. 7 depicts the results of PCR analysis for somatic chimerism: Lanes 1, 5, 9, 13 and 17, 20 PCR products using the liver DNA; Lanes 2, 6, 10, 14 and 18, the muscle DNA; Lanes 3, 7, 11, 15 and 19, the heart DNA; Lanes 4, 8, 12, 16 and 20, the gonad DNA; Lane 21, Korean Ogol chicken genomic DNA; Lane 22, White Leghorn genomic DNA; and Lane 23, no template. As can be seen from Fig. 7, 25 the somatic chimerisms were different between individuals: one of the 5 chicks showed somatic chimerism in all tissue samples (liver, heart, muscle, and gonads). The injected EG cells contributed to the gonads of two hatched chicks and the heart in all of the chicks; two chicks showed the somatic chimerism only in the heart. These results indicate 30 that chicken EG cells can differentiate and contribute in vivo to various tissues including the gonads.

Example 5: Transfection of Foreign Gene into PGCs or EG 35 cells and Selection Thereof

A reporter gene (GFP or Lac Z) was transfected into

- 16 -

PGCs or EG cells using electroporation and liposome, respectively. Transfection efficiency of the gene was about 80% in case of using electroporation and 30% in case of using liposome. Transfected PGCs or EG cells were passaged
5 in a DMEM medium containing 350 μ g/ml of neomycin to select the stably transfected PGCs or EG cells.

While the invention has been described with respect to the above specific embodiments, it should be recognized that
10 various modifications and changes may be made to the invention by those skilled in the art which also fall within the scope of the invention as defined by the appended claims.

- 17 -

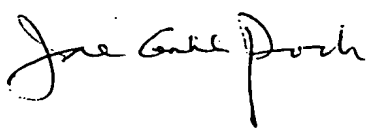
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEPTION IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1

To: Jae Yong Han

Dongbo APT 101-513, Yongin 3 cha, Suji, Yongin-City,
Kyonggi-do 449-840, KOREA

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : CEG (chicken embryonic germ cell line)	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCLRF-BP-00026
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by : <input checked="" type="checkbox"/> A scientific description <input checked="" type="checkbox"/> A proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on September, 22, 1999	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Director Korean Cell Line Research Foundation Address : Cancer Research Institute Seoul National University College of Medicine 28 Yongon-dong, Chongno-Gu Seoul, 110-744, Korea	Signature(s) :  Date : 1999. 10. 25

- 18 -

What is claimed is:

1. A process for preparing an established avian embryonic germ (EG) cell line comprising the steps of:
 - 5 (a) culturing primordial germ cells (PGCs) isolated from an avian embryonic gonad in a medium supplemented with a cell growth factor and a differentiation inhibitory factor to obtain EG cell colonies;
 - (b) culturing the EG cells in the same medium as in
10 step (a) by employing a feeder layer until the EG cells are colonized; and
 - (c) recovering and subculturing the EG cells in the same medium as in step (a) to establish the EG cell line.
- 15 2. The process of claim 1, wherein the avian embryonic gonad is at a stage ranging from 14 to 36.
3. The process of claim 2, wherein the avian embryonic gonad is at a stage ranging from 24 to 30.
20
4. The process of claim 1, wherein the avian species is turkey, chicken, quail, pheasant or duck.
5. The process of claim 1, wherein a layer of
25 germinal ridge stroma cells (GRSCs) is employed as a feeder layer when culturing primordial germ cells in step (a).
6. The process of claim 1, wherein the growth factor is selected from the group consisting of stem cell factor
30 (SCF), basic fibroblast growth factor (bFGF), interleukin-11 (IL-11), insulin-like growth factor-I (IGF-I) and a mixture thereof.
7. The process of claim 1, wherein the medium is
35 supplemented with a growth factor selected from the group consisting of 0.05 to 500 ng/ml of SCF, 0.1 to 1000 ng/ml of bFGF, 0.0004 to 4 ng/ml of IL-11, 0.1 to 1000 ng/ml of IGF-I

- 19 -

and a mixture thereof.

8. The process of claim 1, wherein the differentiation inhibitory factor is leukemia inhibitory factor (LIF).

9. The process of claim 8, wherein the amount of LIF is 0.1 to 1000 units/ml.

10. The process of claim 1, wherein the medium further comprises mammalian or avian serum.

11. The process of claim 1, wherein the medium further comprises a supplementary ingredient selected from the group consisting of sodium pyruvate, glutamine, β -mercaptoethanol and a mixture thereof.

12. The process of claim 1, wherein the feeder layer is mitotically active.

13. The process of claim 1 or 12, wherein the feeder layer is fibroblast or an equivalent thereof.

14. The process of claim 13, wherein the fibroblast is avian fibroblast or avian embryonic fibroblast.

15. The process of claim 14, wherein the avian species is chicken.

16. An avian embryonic germ (EG) cell line prepared in accordance with the process of claim 1.

17. The avian EG cell line of claim 16, which can be maintained by repeated subculture.

18. The avian EG cell line of claim 16, which expresses SSEA-1 antigen, forms an embryoid body, and

- 20 -

differentiates and contributes to various tissues.

19. The avian EG cell line of claim 16, which is a chicken embryonic germ cell line having characteristics
5 substantially identical to that deposited under the accession number of KCLRF-BP-00026.

20. A process for preparing a somatic or germline chimera comprising injecting the avian EG cell of claim 16
10 into an egg.

21. The process of claim 20, wherein the EG cell is injected into a germinal cavity or blood vessel of the egg.

15 22. The process of claim 21, wherein the EG cell is injected into the germinal cavity of the egg at a stage X.

23. The process of claim 21, wherein the EG cell is injected into the blood vessel of the egg at a stage ranging
20 from 13 to 17.

24. A process for transfecting a foreign gene into EG cells or PGCs characterized by using electroporation or liposome.

25

25. A process for selecting stably transfected EG cells or PGCs comprising passaging EG cells transfected by a foreign gene in a medium containing an antibiotic.

1/5

FIG. 1a

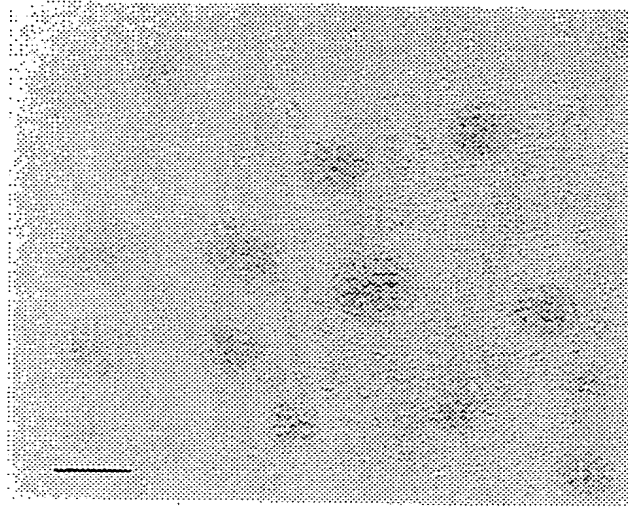
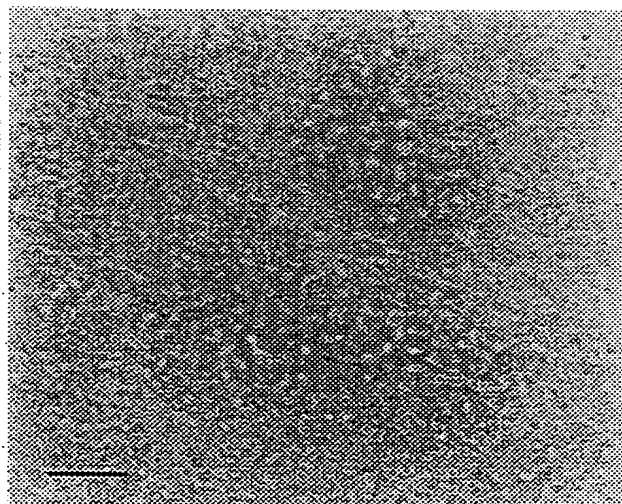


FIG. 1b



2/5

FIG. 2

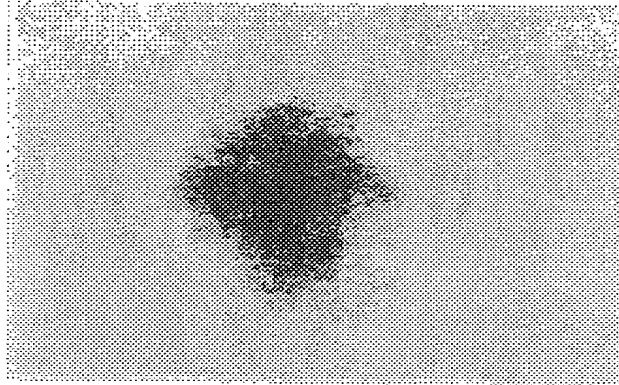


FIG. 3

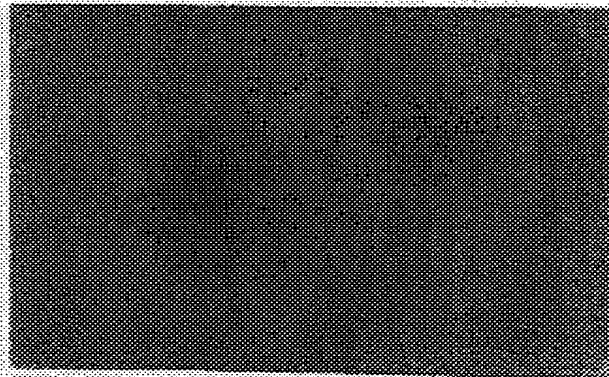
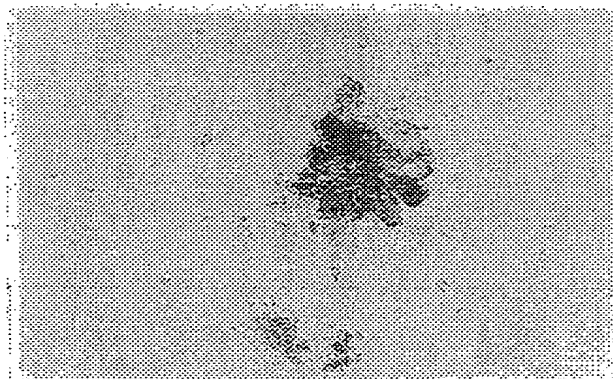


FIG. 4



3/5

FIG. 5a

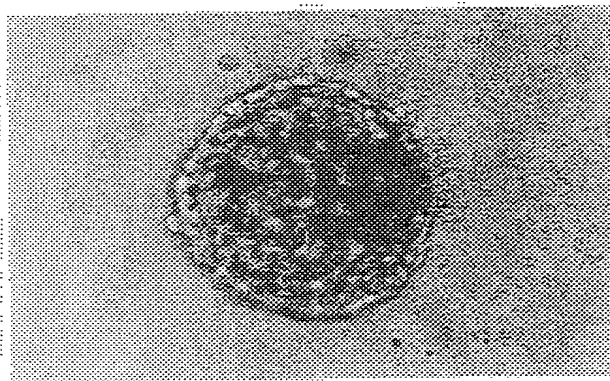


FIG. 5b

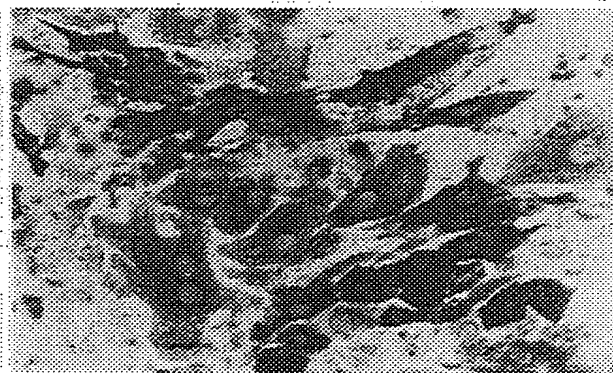
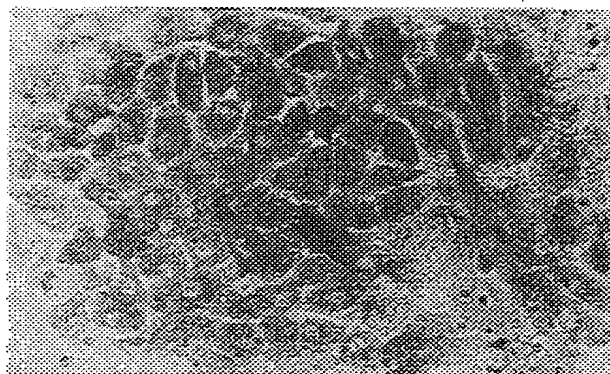


FIG. 5c



4/5

FIG. 5d



FIG. 6a

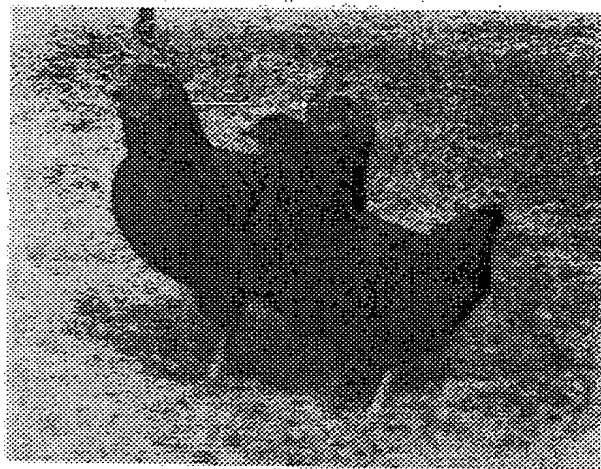
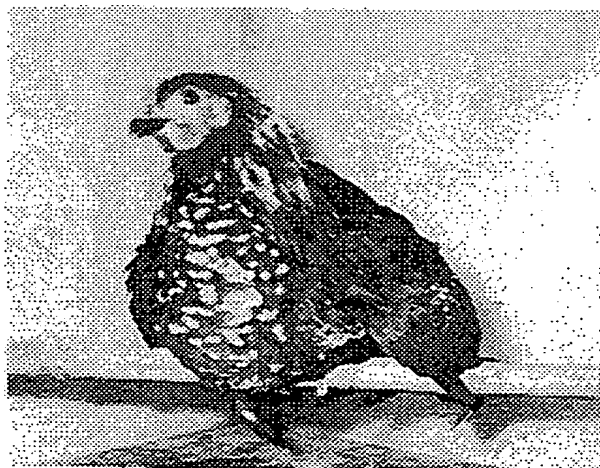
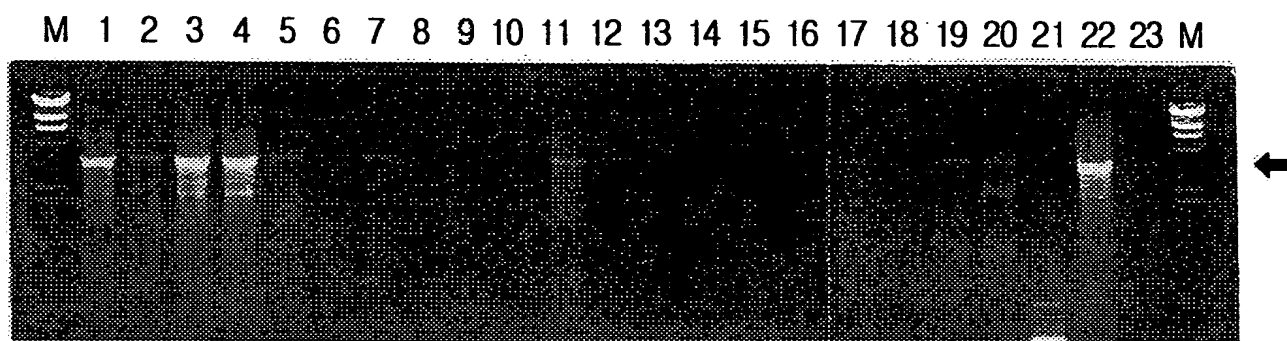


FIG. 6b



5/5

FIG. 7



- 1 -

SEQUENCE LISTING

<110> HAN, JAE YONG
HAM MI PHARM. CO., LTD.
PARK, TAE SUB

<120> AVIAN PLURIPOTENT EMBRYONIC GERM CELL LINE

<130> PC91143/HMY

<150> KR 1999-4860
<151> 1999-02-11

<160> 2

<170> KOPATIN 1.5

<210> 1
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> White Leghorn-specific SCAR primer(forward primer)

<400> 1
aacgcgtaga gttgcaggga tcag 24

<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> White Leghorn-specific SCAR primer (reverse primer)

- 2 -

<400> 2

aacgcgtaga tattcgagta cctt

24

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : C12N 5/02, 5/06, 5/26	A1	(11) International Publication Number: WO 00/08132 (43) International Publication Date: 17 February 2000 (17.02.00)
(21) International Application Number: PCT/US99/17385 (22) International Filing Date: 2 August 1999 (02.08.99) (30) Priority Data: 09/127,624 3 August 1998 (03.08.98) US (71) Applicant: UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS, A PUBLIC INSTITUTION OF HIGHER EDUCATION OF THE COMMONWEALTH OF MASSACHUSETTS, as represented by its AMHERST CAMPUS [US/US]; Office of Vice Chancellor for Research at Amherst, Amherst, MA 01002 (US). (72) Inventors: PONCE DE LEÓN, F., Abel; 27 South Long Lake Trail, North Oaks, MN 55127 (US). BLACKWELL, Catherine; 285 Culter Road, Warren, MA 01083 (US). GAO, Xiu, Ying; 7 Pilgram Way, E. Walpole, MA 02032 (US). ROBL, James, M.; 196 Old Enfield Road, Belchertown, MA 01007 (US). STICE, Steven, L.; 468 Amherst Road, Belchertown, MA 01007 (US). JERRY, D., Joseph; W. Pelham Road, Shutesbury, MA 01072 (US). (74) Agents: TESKIN, Robin, L. et al.; Burns, Doane, Swecker & Mathis, L.L.P., P.O. Box 1404, Alexandria, VA 22313-1404 (US).		(81) Designated States: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>With international search report.</i>
(54) Title: PROLONGED CULTURING OF AVIAN PRIMORDIAL GERM CELLS USING SPECIFIC GROWTH FACTORS AND USE THEREOF (57) Abstract A culture system for maintaining avian PGCs for long periods in tissue culture is provided. This culture system uses LIF, bFGF, IGF-I and SCF. The resultant PGCs are useful for the production of transgenic and chimeric avians, in particular, chickens or turkeys.		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TC	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CJ	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

PROLONGED CULTURING OF AVIAN PRIMORDIAL GERM CELLS USING SPECIFIC GROWTH FACTORS AND USE THEREOF

5

FIELD OF THE INVENTION

The present invention provides a novel method for maintaining avian primordial germ cells (PGCs), in particular chicken PGCs, for prolonged periods in tissue culture. These PGCs can be used for the insertion of desired DNA sequences, e.g., human genes. These cultured PGCs, and transgenic PGCs derived therefrom, may
10 be used to produce chimeric birds, in particular chimeric chickens.

BACKGROUND OF THE INVENTION

In recent years there has been much research focused toward the production of chimeric, cloned and transgenic animals.

In particular, the modification of the genome of farm animal species is an
15 area which has been actively pursued, with varying degrees of success, for the past two decades. For example, such research has been focused toward generating transgenic pigs, cows, and chickens. To date, the majority of the available transgenic animals have been generated by the direct microinjection of single cell embryos with DNA constructs harboring the gene of interest. However, while
20 microinjection techniques have been successful, such methods are disadvantageous in that they are costly and often suffer from low efficiency.

Recently, the success of embryonic stem (ES) cell technology for the production of "knock-out" mice has led to research focused toward the development of

- 2 -

tissue culture systems for ES cells and primordial germ cells (PGCs) in farm animal species. The ability to maintain ES undifferentiated cells in continuous culture enables *in vitro* transfection of such cells and ideally the selection of transfected cells which contain a desired gene prior to their transfer to the inner cell mass of a
5 developing embryo to generate chimeric animals. Ideally, at least some of the resultant chimeric animals will be able to segregate the DNA construct via the germ line and, hence, produce transgenic progeny. However, to date, targeted (site-specific) integrations have only been achieved in mice. Currently, the ability to do targeted DNA integration in other animal species is limited. However, work in this
10 direction is in progress and should be realized soon.

In particular, there has been considerable research targeted toward improving the genome of *Gallinacea* and chickens in particular because of the considerable economic importance thereof. A fairly complete review of the state of research directed at the generation of transgenic chickens was published three years ago
15 (Sang, *Trends in Biotech.*, 12:415-420 (1994)). As discussed therein, there are basically two alternative routes under investigation for producing transgenic chickens. These methods can be distinguished based on the time when manipulation of the genome is effected, i.e., before lay or after lay. The latter method includes the transfer of donor ES and PGC to recipient embryos. Moreover, in both
20 routes, the bulk of the work has been effected by infecting donor cells with retroviral vectors containing a gene of interest.

The first approach, which comprises manipulation of the genome before lay has yielded mixed and/or inefficient results. For example, the infection of oocytes in the ovary (Shuman, and Shoffner, *Poultry Sci.*, 65:1437-1494 (1986) and pre-
25 incubation of sperm with plasmid DNA (Gruenbaum et al., *J. Cell. Biochem Supp.*,

- 3 -

15:194 (1991) were inefficient and have not been repeated. Also, the transfection of sperm cells with a plasmid construct by lipofection has been demonstrated (Squires and Drake, *Anim. Biotech.*, 4:71-78 1993). However, germ line transmission was not reported.

5 Also, the direct microinjection of DNA into the germinal disk followed by embryo culture has been reported to yield 0.1% live transgenic chimeric birds (Sang, W., *Trends in Biotech.*, 12:415-42 (1994)) with one bird transmitting the transgene to 3.4% of its offspring (Love et al., *Bio/Technology*, 12:60-63 (1994)). This same approach was taken by Naito et al (*J. Reprod. Fertil.*, 102:321-325
10 (1994)). However, similarly no germ line transmission of the transgene was reported therein.

 The second approach, which comprises manipulation of the genome after lay, has yielded better results. Chimeric birds, generated by injection of laid eggs with replication competent retroviral vectors, have shown germ line transmission to 1%
15 and 11% of their offspring (Salter et al., *In Manipulation of the Avian Genome*, Etches, RJ et al., eds. pp 138-150 CRC Press (1993)). More encouraging results, using replication-defective retroviral vectors and injection into laid eggs, generated 8% chimeric male birds that transmitted the vector to their offspring at a frequency of 2 to 8% (Bosselman et al., *Science*, 243:535-535 (1989)).

20 However, the injection of laid eggs with plasmid constructs in the presence of reagents known to promote transfection has failed to yield stably integrated or constructs or transgenic birds (Rosenblum and Cheng, J., *Cell Biochem Supp.*, 15E 208 (1991)). In general, the use of retroviral vectors for the generation of transgenic chickens is not widespread because of significant disadvantages associated
25 therewith. Such disadvantages include the constraints on the size of the cloning

- 4 -

insert that can be stably introduced therein and the more serious potential disadvantage of possibly inducing recombination events with endogenous viral loci or with other avian leukosis viruses.

A significant problem with all of these methods is the fact that long term
5 culture systems for chicken ES and PGC have been relatively difficult to establish. To the best of the inventors' knowledge, it is believed that the longest avian PGCs have been cultured with the successful production of chimeric birds is less than 5 days.

Previous PGC culturing methods have included the use of growth factor, in
10 particular LIF or IGF-I. However, as noted, such methods have not been able to provide for prolonged culturing periods, a prevalent concern as it would facilitate the production of transgenic PGCs.

Notwithstanding the problems in achieving long term culturing, both ES and PGC cells have been successfully used to generate chimeras by infection of such
15 cells with replication competent and incompetent retroviral vectors. Further, as discussed above, freshly obtained blastodermal cells have been injected into recipient embryos, resulting in birds with chimeric gonads (Carsience et al., *Devel.*, 117:669-675 1993)). Blastodermal cells can be efficiently transfected by lipofec- tion and then transferred into recipient embryos. However, germ line transmission
20 of transfected cells has not been reported.

Also, Pain et al., *Devel.*, 122:2329-2398 (1996), have recently demonstrated the presence of putative chicken ES cells obtained from blastodermal cells. They further reported maintenance of these cells in cultures for 35 passages assertedly without loss of the ES phenotype (as defined by monoclonal antibodies to mouse
25 ES cells). (*Id.*) These cells apparently develop into PGC's upon transfer into avian

- 5 -

embryos where they colonize in the gonads. However, they did not establish definitively that these cells were in fact ES cells.

The cross-reactivity of mouse ES monoclonal antibodies with chicken ES cells might argue favorably for conservation of ES cell receptors across species. Also, the fact that these researchers were also able to generate two chimeric chickens with injections of 7 day old blastodermal cell cultures would arguably suggest the presence of ES cells in their system. However, these researchers did not rule out the possibility that PGCs were present in their complex culture system. Thus, this long term ES culture system should be further tested for pluripotency and germ line transmission. (Id.)

An alternative route to the production of ES cells, comprises PGCs. Procedures for the isolation and transfer of PGCs from donor to recipient embryos have been developed and have successfully generated chimeric chicken with germ line transmission of the donor genotype (Vick et al., *London Ser. B*, 251:179-182 (1993), Tajima et al., *Theriogenology*, 40:509-519 (1993)). Further, PGCs have been cryopreserved and later thawed to generate chimeric birds (Naito et al., *J. Reprod. Fertil.*, 102:321-325 (1994)). However, this system is very labor intensive and only yields, on average, only 50 to 80 PGCs per embryo. Infection of PGCs with retroviral vectors has also been reported. However, to date, the growth of PGCs in culture for prolonged periods to facilitate selection of transfected PGCs has not been achieved. Thus, based on the foregoing, it is clear that improved methods for culturing PGCs comprises a significant need in the art.

- 6 -

OBJECTS OF THE INVENTION

It is an object of the invention to solve the problems of the prior art.

It is a more specific object of the invention to provide a novel method for culturing avian primordial germ cells (PGCs) for prolonged periods in tissue culture.

It is an even more specific object of the invention to provide a novel method for culturing *Gallinacea*, especially chicken, primordial germ cells (PGCs) for prolonged periods in tissue culture.

It is another object of the invention to use avian primordial germ cells which have been cultured for prolonged periods in tissue culture for the production of chimeric avians, preferably poultry, and most preferably chickens or turkeys.

It is another object of the invention to introduce desired nucleic acid sequences into avian primordial germ cells which have been cultured for prolonged periods in tissue culture.

It is yet another object of the invention to use avian primordial germ cells, which have been maintained in culture for prolonged periods, into which a desired nucleic acid sequence has been introduced, for the production of transgenic chimeric avians, preferably transgenic chimeric chickens or turkeys.

It is still another object of the invention to use such transgenic chimeric avians, preferably *Gallinacea* and most preferably chickens, for the production of heterologous protein(s) encoded by a nucleic acid sequence contained in cells introduced therein, preferably by recovery of such protein(s) from the eggs of such transgenic chimeric avians, in particular transgenic chimeric chickens. Alternatively, such proteins may be obtained from the chimeric bird directly, e.g., isolated from the blood or other tissues.

- 7 -

BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION

As discussed, the present invention provides a novel method for maintaining avian (chicken) primordial germ cells (PGCs) in tissue culture for prolonged periods, i.e., for at least 14 days, more preferably at least 25 days, and ideally
5 indefinitely.

Prior to the present invention, there were not reported any methods for maintaining avian PGCs in tissue culture which provided for their maintenance for longer than about 5 days (as demonstrated by their ability to produce chimeric avians). The present inventors have surprisingly discovered, by judicious
10 experimentation, that the use of a culture media containing at the least the following growth factors: leukemia inhibitory factor (LIF), basic fibroblast growth factor (bFGF), stem cell factor (SCF) and insulin-like growth factor (IGF-I) enables avian primordial germ cells, specifically chicken primordial germ cells to be maintained and to proliferate for prolonged periods, i.e., at least 14 days, and for substantially
15 longer in tissue culture. Moreover, these PGCs have been demonstrated to be useful for the generation of chimeric chickens.

Also, these PGCs should be useful for the production of transgenic avian PGCs, which can be used to produce transgenic chimeric avians. It is expected that these transgenic chimeric avians will be useful for recovery of heterologous
20 proteins, which preferably can be recovered directly from the eggs of such chimeric transgenic avians. For example, such avians can be used for the production and recovery of therapeutic proteins and other polypeptides.

- 8 -

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Thus, the present invention obviates the problems associated with previous avian PGC culturing methods which did not enable such PGCs to be maintained in tissue culture for periods longer than about five days. In particular, the present
5 inventors have surprisingly discovered that avian PGCs, preferably *Gallinacea* PGCs, and most preferably chicken PGCs can be maintained in tissue culture for prolonged periods, in at least 14 days, more preferably at least 25 days, and preferably longer, by the use of culture medium which contains at least the following four growth factors:

10 leukemia inhibiting factor (LIF), stem cell factor (SCF), insulin-like growth factor (IGF-I) and basic fibroblast growth factor (bFGF).

In general, the present culturing method comprises the following steps:

- (i) isolating PGCs from donor avian embryos; and
- 15 (ii) culturing said isolated avian PGCs in a culture medium containing relative amounts of LIF, bFGF, SCF and IGF-I effective to promote their proliferation, for a prolonged time, i.e., at least 14 days, in tissue culture. Prolonged periods, as defined above, refers to a culture period 14 days or longer.

Methods for isolation of primordial germ cells from donor avian embryos
20 have been reported in the literature and can be effected by one skilled in the art. (See, e.g., JP 924997 published September 7, 1993 Pub. No. 05-227947; Chang et al., *Cell Biol. Int.*, 19(2):143-149 (1992); Naito et al., *Mol. Reprod. Devel.*, 39:153-161 (1994); Yasuda et al., *J. Reprod. Fert.*, 96:521-528 (1992); and Chang et al., *Cell Biol. Int. Reporter*, 16(9):853-857 (1992), all of which are incorporated by
25 reference in their entirety therein).

- 9 -

The present inventors elected to isolate avian PGCs from chicken eggs which had been incubated for about 53 hours (stage 12-14 of embryonic development), removal of embryos therefrom, collection of embryonic blood from the dorsal aorta thereof, and transferral thereof to suitable cell culture medium (M199 medium).

5 These PGCs were then purified by ficoll density centrifugation, and resuspended in 10 μ l of the growth factor containing culture medium of the present invention. However, as discussed above, other methods for isolating PGCs are known and may alternatively be used.

The isolated PGCs are then counted and separated manually (e.g., using a
10 pipette). Thereafter, PGCs collected from these different avian embryos are pooled (to increase PGC numbers) and incubated in the subject growth factor containing medium.

This culture medium, hereinafter referred to as "complete" medium contains LIF, bFGF, SCF and IGF-I as well as other substituents typically comprised in PGC
15 and embryonic stem cell medium. More specifically, the subject "complete" medium will preferably comprise α -MEM, a well known commercially available cell growth medium to which has been added the above four growth factors and which additionally includes 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 0.56% antibiotic/antimitotic, 34.56 mM 2- β mercaptoethanol, 1.0 U/ μ l LIF, 40.0 pg/ μ l
20 bFGF, 60.0 pg/ μ l IGF-I and 80.0 pg/ μ l of SCF.

Based on the experiments conducted to date, these are believed to correspond to the preferred concentrations of these growth factors. However, as described *infra*, the amounts of these growth factors can be varied with PGCs being successfully maintained in tissue culture. In particular, it is known that the
25 respective amounts of these growth factors may be increased with no adverse

- 10 -

effects. Moreover, these preferred amounts may vary, e.g., if PGCs of other avians are cultured.

As noted, the present inventors used as the base medium, α -MEM, a well known commercially available tissue culture medium. However, it is expected that
5 other media may be substituted therefor, provided that these four essential growth factors are also present. Applicants particularly contemplate modification of the subject "complete media" to eliminate fetal calf serum, because of its undefined and variable composition.

Also, while applicants cultured PGCs in the absence of feeder cells, they
10 further contemplate that feeder cells may also be useful. In particular, the use of fibroblasts, preferably avian fibroblasts, and most preferably *Gallinacea* fibroblasts (still more preferably chicken fibroblasts), will provide for maintenance of PGCs in tissue culture provided that the four essential growth factors are present. Moreover, these feeder cells may be transfected with genes encoding these growth
15 factors, thereby eliminating the need for the exogenous addition of these factors during culturing. Essentially, the cells will provide a continual source of these growth factors. (This will be achieved by placing these growth factor genes under control of constitutive strong promoter and also sequences that provide for the secretion thereof, thereby making these growth factors available to cultured PGCs.)

20 As noted, the amounts of these factors refer to relative amounts thereof effective to enable prolonged culturing of avian PGCs, preferably *Gallinacea* PGCs, and most preferably chicken or turkey PGCs, for prolonged periods in tissue culture.

Preferably, the relative amounts of these growth factors will fall within the following ranges:

- 11 -

LIF 0.1 U/ μ l to 100.0 U/ μ l, more preferably 1.0 to 10.0 U/ μ l and most preferably 1.0 to 2.0 U/ μ l;

IGF-I 6.0 pg/ μ l to 6000.0 pg/ μ l, more preferably 60.0 pg/ μ l to 600.0 pg/ μ l by weight and most preferably 60.0 pg/ μ l to 120.0 pg/ μ l;

5 SCF 8.0 pg/ μ l to 8000 pg/ μ l by weight, more preferably 80.0 pg/ μ l to 800.0 pg/ μ l and most preferably 80.0 pg/ μ l to 160.0 pg/ μ l by weight; and

bFGF 4.0 pg/ μ l to 4000.0 pg/ μ l, more preferably 40.0 pg/ μ l to 400.0 pg/ μ l by weight and most preferably 40.0 pg/ μ l to 80.0 pg/ μ l.

In the ranges set forth above, the upper ranges are not critical to the invention
10 and are largely dictated by cost (given the significant expense associated with manufacture of growth factors).

However, it is expected that these preferred ranges may vary, e.g., if α -MEM is substituted by another growth medium and if other types of avian PGCs are cultured.

15 As discussed, these PGCs can be maintained for long periods in culture with the successful production of chimeric avians. To date, the cells have been maintained in tissue culture for up to about 4 months, with apparently no adverse effects. Also, cells of up to 25 days have been tested for their ability to effectively colonize avian embryonic gonads and produce chimeric birds. However, it is
20 expected that these cells can be cultured indefinitely, with retention of the ability to produce chimeric birds.

Methods for using PGCs to produce chimeras are known in the art as evidenced by the prior art discussed *supra*. Preferably, PGCs will be transferred into recipient avian embryos according to the methods disclosed in the example
25 while follows. Thereafter, successful chimera production is evaluated based on

- 12 -

migration and colonization of PGCs in the gonads, retention of PGC phenotype, or by looking for the presence of donor PGCs in gonads after hatching and breeding.

In the present example, the inventors selected genotypes which are easily followed which affect coloration. Donor birds were white broiler type and recipient
5 birds were black feathered birds, respectively, having specific potential genotypes. The putative chimeras were black feathered and produced black/white progeny when mated with black birds. Thereby, successful chimeras were demonstrated based on the production of black/white feathered progeny produced after mating the putative chimeric bird with another black feathered bird.

10 In a second strategy Bar Rock birds were used as recipients, and white feathered birds used as donors. Putative chimeric birds were demonstrated based on the production of white feathered progeny having some barred feathers.

However, the subject method should be applicable for introducing any desired trait by chimerization. This will, of course, depend on the genotypic
15 properties of the transferred PGCs.

As discussed, a significant application of the subject PGCs, which can be maintained in culture for long periods, is for the production of chimeric avians. This will be accomplished by introducing a desired DNA sequence into the cultured PGCs. Means for introducing DNAs into recipient cells are known and include
20 lipofection, transfection, microinjection, transformation, microprojectic techniques, etc. In particular, the present inventors initially elected to introduce a vector containing a reporter gene by lipofection. However, while transiently transfected PGCs were produced, a stable transfected cell line has not, as yet, been isolated. However, it is expected that this can be accomplished by known techniques using
25 the subject PGCs.

- 13 -

Preferably, a DNA will be introduced that encodes a desired gene, e.g., therapeutic polypeptide, growth factor, enzyme, etc., under the regulatory control of sequences operable in avians. Preferably, these regulatory sequences will be of eukaryotic origin, most preferably avian, e.g., chicken regulatory sequences.

5 Promoters operable in avian cells, e.g., derived from avian genes or viruses are known in the art.

Initially, a stable cell line which produces the desired protein will be isolated and used for chimera production. Also, it is desirable that the introduced DNA contain a marker DNA, the expression of which is easily detected, to more easily

10 identify cells containing the inserted DNA. Such selectable markers are well known and include β -lactamase, β -galactosidase, neomycin phosphotransferase, etc.

Injection of the resultant transgenic PGCs into avian embryos will then result in the production of transgenic chimeric avians. Preferably, the desired protein will then be recovered from the eggs of these transgenic avians, thereby providing a

15 continual supply of the protein. Alternatively, the protein can be recovered from chimeric birds directly, e.g., isolated from the systemic circulatory system.

EXAMPLE

The following materials and methods were used in the experiments described below.

20 Materials and methods

Animals

White (E/E and I/I) broiler type chickens have been used as donors of PGCs to develop the long term PGC culture system. Two types of bird were used as recipient embryos, a dominant black feather (E/- and i/i) chicken line and a Bar

- 14 -

Rock (E/E and i/i) line. Dominant black birds injected with white broiler (WB) type PGCs are referred as E/-(WB) and Bar Rock birds injected with white broiler type PGCs are referred as BR(WB).

Extraction of PGCs

5 Stage 13 to 14 embryos were selected for PGC extraction. PGCs were collected from the dorsal aorta with a fine micropipette as described by Naito et al., *Mol. Reprod. Dev.*, 37:167-171 (1994). PGCs from 20 embryos were pooled in Hanks' solution supplemented with 10% fetal bovine serum and concentrated by Ficoll density gradient centrifugation (Naito et al., *Mol. Reprod. Dev.*, 39:153-171
10 1994). PGCs were counted and distributed in 10 μ l drops of culture medium (DMEM, containing differing amounts of growth factors) at about 100 PGCs per drop. Culture drops were overlaid with sterile light mineral oil.

Injection of PGCs into recipient embryos

 Stage 14-15 embryos were used as recipient embryos. After placing the egg
15 on an appropriate surface, time was allowed for the developing embryo to position itself on the upper side of the resting egg. A small, about 10 mm "window" or less in the shell was made with a fine forceps. The embryo was brought close to the surface by adding a mixture of phosphate buffer saline with 4% antibiotics. After accommodating the embryo to visualize its heart, the marginal vein and/or dorsal
20 aorta could be easily identified. Two hundred donor PGCs in 2 μ l of media containing 0.04% trypan blue were taken into a micropipette. PGCs were injected into the dorsal aorta of the recipient embryo. Trypan blue, an inert cell dye, allowed visualization of the PGC suspension when it was being delivered. After injection the egg shell opening was closed with surgical tape and reinforced with paraffin.

- 15 -

Eggs were maintained for 24 hours under surveillance in a humidified CO₂ incubator and later transferred to a regular incubator until hatching.

Viable fluorescent staining of PGCs

To evaluate the success of transfers and/or the ability of PGCs to migrate to
5 the gonads, PGCs were stained with DiI fluorescent stain. Embryos were collected after 24 hours of transfer, placed on a petri-dish and observed under an inverted microscope equipped for epi-fluorescent analysis.

PGC culture conditions

Several concentrations of human leukemia inhibitory factor (Lif), human
10 basic fibroblast growth factor (bFGF), human insulin-like growth factor (IGF-I) and human stem cell factor (SCF) have been tested. Likewise, mitomycin treated chicken fibroblast and mouse STO cell feeder layers were tested.

PGCS LONG-TERM CELL CULTURE MEDIUM

In the experiments that follow, the complete cell culture medium comprised
15 the following constituents: α -MEM (BioWhittaker, Walkersville, MD, Cat# 12-169F), 10% fetal calf serum (Hyclone, Logan, UT, Cat# 30070.03), 2 mM L-glutamine (Sigma, St. Louis, MO, Cat# G7513), 0.48% antibiotic/antimycotic (Sigma, St. Louis, MO, Cat# A7292), 132 μ M 2B mercaptoethanol (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, Cat 2195-023), 0.00625 U/ μ l of leukemia inhibitory factor (LIF),
20 0.25 pg/ μ l of basic fibroblast growth factor (b-FGF), 0.5625 pg/ μ l of insulin like growth factor (IGF-I) and 4.0 pg/ μ l of stem cell factor (SCF) (Genzyme, Cambridge, MA, Cat#'s 1999-01, 1208-00, FG1211-1 and 1833-01 for LIF, bFGF, IGF-1 and SCF, respectively). Medium changes were carried out every other day by removing 5 μ l of medium and adding 5 μ l of 2X new medium. The latter
25 assumed that growth factors will be labile after some period of continuous culture.

- 16 -

However, the net result is that the concentration of growth factors is doubled. Hence, the final medium contains now the following growth factor concentrations: 0.0125 U/ μ l of leukemia inhibitory factor (LIF), 0.5 pg/ μ l of basic fibroblast growth factor (bFGF), 1.125 pg/ μ l of insulin like growth factor-I (IGF-I) and 8.0 pg/ μ l of stem cell factor (SCF). The range of growth factor concentrations described here promote the maintenance and proliferation of PGCs in continuous culture. Moreover, it has subsequently been found that these cells survive and proliferate optionally in the concentrations identified *supra*. (Also, it has subsequently been demonstrated that the growth factors can be changed in the above-culture medium.

10 In particular, as discussed *supra*, a particularly preferred culture medium for maintaining primordial germ cell cultures will comprise the same substituents as above wherein the amounts of LIF, IGF-I, SCF and bFGF are as follows:

	LIF	:	1.0 unit/ μ l
	bFGF	:	40.0 pg/ μ l
15	SCF	:	80.0 pg/ μ l
	IGF-I	:	60.0 pg/ μ l.)

Using these culturing conditions, PGCs were found to form large, dense, loosely adherent clumps of cells (some of the clumps have several hundreds of cells in them) within 3 to 4 days after collection. At the end of 7 days the clumps start to have large numbers of dead cells and cellular debris surrounding them. PGC clumps survive up to four weeks before they become cell monolayers. At weeks 1, 2 and 3, clumps have been dissociated, stained with a vital dye DiI and transferred into recipient embryos. At all three time-points cells were found in the gonads of some of the recipient embryos. The number of cells and the number of embryos

20

- 17 -

showing stained PGCs in the gonads was inversely proportional to the age of the PGCs culture.

PGC TRANSFER INTO RECIPIENT EMBRYOS

For PGC transfer, the recipient egg was positioned horizontally under a
5 dissecting scope. A small hole was pierced into the air space of the egg to lower the
internal pressure of the egg and prevent leakage. A 10 mm window was opened on
the ventral surface of the egg and ~ 1 ml of PBS with 4% antibiotic/antimitotic was
injected through the hole to bring the embryo up until it was slightly less than flush
with the egg shell window. To inject the PGCs, a 30 μ m pipet was beveled and then
10 pulled using a microforge to form a fine point with polished edges. Two hundred
PGCs per embryo transfer, dissociated as described below, were picked up
manually using a needle-pipette and a suction tube. Prior to transfer, and while in
the pipette, PGCs were mixed with a 0.04% solution of trypan blue stain. The total
injection volume per embryo was 2 μ l. For the final step, the recipient embryo was
15 positioned to reveal a portion of the marginal vein. The needle-pipette with the
PGCs was inserted and the contents carefully expelled. The needle-pipette was held
in place for a few seconds and then removed. Recipient eggs were sealed with 2
layers of surgical tape followed by paraffin wax coating of the entire area.
Recipient eggs were then placed back into a rotating incubator and incubated until
20 hatching.

EVALUATION OF THE PGC PHENOTYPE

Chicken PGCs are positive for periodic acid Schiff staining (PAS) and are
claimed to be positive for alkaline phosphatase. However, there is no convincing
evidence that chicken PGCs are positive for the latter. In the absence of an
25 alternative enzymatic or molecular marker method to characterize chicken PGCs,

- 18 -

their phenotype was evaluated by transferring cells to recipient embryos and evaluating their presence in the gonads of the developing embryo. This method required culturing the PGCs in 100 µg/ml DiI in a α -MEM medium and rinsing prior to transfer to recipient embryos. Twenty-four hours post-transfer recipient
5 embryos were removed and placed under an inverted microscope. DiI labeled cells observed in the gonads were interpreted as successful PGC migration to the gonads and confirmation of retention of PGC characteristics. A second method to evaluate the retention of the PGC phenotype was pursued by letting recipient embryos go to hatching and then evaluate the presence of donor PGCs in their gonads after
10 breeding.

BREEDING STRATEGY FOR PGC EVALUATION

Two breeding strategies were followed. The first strategy used recipient black feathered birds with possible genotype i/i, E/E, s/s, b/b and donor white feathered broiler type birds with genotype I/I, E/E, S/S, B/B. To prove that
15 recipient animals were chimeric, that is to say that contain their own PGCs and donor PGCs in their gonads, they were mated to pure black feathered birds. If the resulting progeny was all black feathered then the animal was assumed to be non chimeric. However, if some of the progeny was white feathered with some black feathered patches then the recipient animal would be chimeric. For the second
20 breeding strategy Bar Rock birds were used as recipient embryos while white feathered broiler type birds were continued to be used as donors. In this latter case when putative chimeric birds were mated to pure Bar Rocks, the presence of white feathered progeny with some barred feathers would identify a positive chimeric bird. Fifty progeny were obtained from each putative chimeric bird before
25 concluding on its chimeric status.

- 19 -

PROGENY TESTS

Putative chimeric E/-(WB) birds when crossed to WB birds produced pure white chicks when they originated from a donor (WB) PGC and, white with black speckled feathers chicks when they originated from the (E/-) PGC. Similarly, when
5 BR(WB) were crossed to WB birds. pure white chicks were produced when originating from a donor (WB) PGC and white-speckled black chicks when they originated from a (BR) PGCS. Crosses between putative BR chimeric birds were also done. For the latter, white chicks were produced when fertilization between two (WB) PGCs occurred and black chicks were the result of fertilization with two
10 (BR) PGC. The intermediate white chick with speckled black feathers only happened when a (BR) PGC was fertilized by a (WB) PGC.

LONG-TERM CULTURES BEYOND 25 DAYS

After 25 days of continuous cultures, PGC clumps form rapidly spreading monolayers. These monolayers of cell shave a flat adherent base and looser clumps
15 and chains of PGC like cells on the upper surface. Some packets of these monolayers of cells remain PAS positive. DiI stained cells obtained from these monolayers have been transferred to recipient embryos. Some embryos have shown few cells localized in their gonads. Cell monolayers have been passaged successfully. Generally, these cells are capable of undergoing 3 to 5 passages
20 before they start to slow down their proliferation, age and become fibroblastic looking. There are few cell lines that have gone through multiple passages and continue to thrive without apparent differentiation for about four months in continuous culture.

Two cells lines obtained from monolayers, P102896 and P110596, have been
25 frozen. The former did not show apparent differentiation and was marginally

- 20 -

positive for alkaline phosphatase while the latter showed neuronal cell morphology and was strongly positive for alkaline phosphatase. Further characterizations of PGC monolayers as described here remain to be assessed for totipotency and pluripotency.

5

Summary of Results

Chimeric chickens were generated from fresh and cryopreserved PGCS. Twenty-five (74%) out of 34 putative chimeric chickens, produced with fresh PGCs transfers, proved to be true chimeric animals after progeny testing. Thirty (88%) out of 34 putative chimeric birds, produced with cryopreserved PGCs, were
10 demonstrated to be true chimeric chickens. In all cases, at least 40 progeny were produced and the number of donor PGCs that were fertilized per chimeric bird varied from 1.4% to 100%, with the majority ranging between 30% to 60%. Assuming that the latter is a reflection of the number of PGCs that migrated to the gonad after injection, then the range of success per injection was varied. However,
15 other mechanisms might be operating that might impact the number of PGCs that become established in the recipient gonad. Such mechanisms were not evaluated in this study. Also, on average, we did not observe any significant alteration of sex ratio in the progeny of chimeric birds.

PGC culture conditions

20

None of the cell feeder layers evaluated in this study improved the long term culture conditions of the PGCS. None of the growth factors alone, at any of the concentrations studied, was able to sustain PGCs in vitro without differentiation. Combinations of two and three growth factors were also tested with little success. Based on our results, it appears that all of the factors described above (LIF, BFGF, IGF-I and SCF) are required for long term culture of PGCS. We are still testing
25

- 21 -

different concentrations and combinations of the above mentioned growth factors in an effort to define the best possible conditions for long term culture of PGCS. Based on DiI staining of PGCs we have observed that, under our culture conditions, PGCs originating from 14 day old continuous cultures migrate to the gonads of
5 recipient embryos after injection. We have also transferred PGCs that have been maintained in culture for 25 days to three recipient embryos. One of these embryos was chimeric as demonstrated by progeny testing.

PGC phenotype under long term culture conditions

After collection, PGCs are recognized by their size and by the presence of
10 lipid droplets in their cytoplasm. At about 48 hours after collection, PGCs clump together and start dividing as evidenced by the growth in size of the clump and the number of cells observed after trypsin dissociation of the clump. Only PGCs that form clumps survive, all others die. Generally, a culture starting with 100 PGCs would end up with an average of 600 to 800 PGCs within seven days. Clearly some
15 PGCs divide, albeit not at an efficient rate. However, as indicated above, these PGCs maintain their ability to migrate to the gonads.

LONG-TERM CULTURES BEYOND 25 DAYS

After 25 days of continuous cultures, PGC clumps form rapidly spreading monolayers. These monolayers of cells have a flat adherent base and looser clumps
20 and chains of PGC like cells on the upper surface. Some packets of these monolayers of cells remain PAS positive. DiI stained cells obtained from these monolayers have been transferred to recipient embryos. Some embryos have shown few cells localized in their gonads. Cell monolayers have been passaged successfully. Generally, these cells are capable of undergoing 3 to 5 passages
25 before they start to slow down their proliferation to age and become fibroblast-like

- 22 -

in appearance. There are few cell lines that have gone through multiple passages and continue to thrive without apparent differentiation for about four months in continuous culture.

Two cell lines obtained from monolayers, P102896 and P110596, have been
5 frozen. The former did not show apparent differentiation and was marginally positive for alkaline phosphatase while the latter showed neuronal cell morphology and was strongly positive for alkaline phosphatase. Further characterization of PGC monolayers as described here remains to be assessed for totipotency and pluripotency.

10 In particular, it has been shown that PGCs cultured using the above four growth factors for at least 25 days can successfully colonize the gonads and produce chimeric chickens. Also, we have maintained PGC cells in culture for up to four months. These cultures still appear to comprise cells having the desired PGC phenotype. While these cells were not tested for their ability to produce chimeric
15 birds, based on their appearance, it is expected that they should be useful therefor.

PGC transfection

Lipofection of a vector containing the green fluorescence protein reporter gene has been used for transfection of PGCS. On average 1/50 PGCs were transiently transfected, however, no stable transfected cell line has been developed
20 yet.

In summary, these results indicate that PGCs can be maintained for long periods and successfully used for the production of chimeric birds. Further changes on growth factor(s) concentrations and the use of other growth factors may further optimize culturing conditions. To be useful, a PGC culture system should allow for
25 transfection and selection of PGCs while maintaining the PGC ability to migrate to

- 23 -

the gonads. Also, as disclosed in more detail in a related application (filed on even date), chicken PGCs, August 3, 1998 after prolonged culturing, revert to the ES cell phenotype, as occurs with mouse PGCs (Matsui et al., *Cell*, 70:841-847, 1992). Therefore, injection of dispersed ES cells into recipient blastoderms should provide another means for the generation of chimeric and transgenic chickens.

- 24 -

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A culturing method which provides for maintenance of avian primordial germ cells for prolonged periods comprising the following steps:

- (i) isolating primordial germ cells from a desired avian; and
- (ii) culturing said primordial germ cells in a culture medium containing at least the following growth factors contained in amounts sufficient to maintain said PGCs for prolonged periods in tissue culture:

- (1) leukemia inhibitory factor (LIF),
- (2) basic fibroblast growth factor (bFGF),
- (3) stem cell factor (SCF) and
- (4) insulin-like growth factor (IGF-I), for a prolonged time period.

2. The method of Claim 1, wherein the minimal amounts of said growth factors preferably range from:

- (1) LIF 0.1 U/ μ l to 100.0 U/ μ l
- (2) bFGF 4.0 pg/ μ l to 4000 pg/ μ l
- (3) IGF-I 6.0 pg/ μ l to 6000.0 pg/ μ l, and
- (4) SCF 8.0 pg/ μ l to 8000 pg/ μ l.

3. The method of Claim 2, wherein the amounts of said growth factors more preferably range from

- (1) LIF 1.0 U/ μ l to 10.0 U/ μ l
- (2) bFGF 40.0 pg/ μ l to 400.0 pg/ μ l
- (3) IGF-I 60.0 pg/ μ l to 600.0 pg/ μ l, and

- 25 -

(4) SCF 80.0 pg/ μ l to 800.0 pg/ μ l.

4. The method of Claim 1, wherein said avian PGCs are obtained from an avian of the genus *Gallinacea*.

5. The method of Claim 4, wherein said PGCs are chicken PGCs or turkey PGCs.

6. The method of Claim 1, wherein said PGCs are maintained in culture for at least 14 days.

7. The method according to Claim 6, wherein said PGCs are maintained in culture for at least 25 days.

8. The method according to Claim 7, wherein said PGCs are maintained in culture for at least 4 months.

9. The method of Claim 1, which further comprises:

(iii) transfecting or transforming the resultant PGCs with a desired nucleic acid sequence.

10. The method of Claim 9, wherein said nucleic acid sequence encodes a therapeutic polypeptide.

11. An improved method of producing chimeric avians which comprises:

- 26 -

- (i) isolating primordial germ cells from an avian;
- (ii) maintaining such PGCs in a tissue culture medium containing at least the following growth factors;
 - 5 (1) leukemia inhibitory factor (LIF),
 - (2) basic fibroblast growth factor (bFGF),
 - (3) stem cell factor (SCF) and
 - (4) insulin-like growth factor (IGF-I);
- (iii) transferring said PGCs into a recipient avian embryo; and
- (iv) selecting for chimeric avians which have the desired PGC phenotype.

12. The method according to Claim 11, wherein said PGCs are derived from avian embryos of the genus *Gallinacea*.

13. The method according to Claim 12, wherein said avian embryos are turkey or chicken embryos.

14. The method according to Claim 11, wherein said PGCs are transfected or transformed with a desired nucleic acid sequence prior to transferral to a recipient avian embryo.

15. The method according to Claim 14, wherein said nucleic acid sequence encodes a therapeutic polypeptide.

- 27 -

16. The method according to Claim 15, which further includes purifying said therapeutic polypeptide from the eggs of the chimeric avians produced according to step (iv).

17. The method according to Claim 11, wherein the PGCs are injected into the dorsal aorta and/or marginal vein of a recipient avian embryo or into recipient blastoderms.

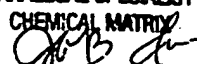
18. An avian PGC cell line obtained by the culturing method of Claim 1.

19. The cell line of Claim 18, which is a chicken or turkey PGC cell line.

20. The cell line of Claim 18, which contains an inserted nucleic acid sequence.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/17385

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : C12N 5/02, 05/06, 05/26; US CL : 435/325, 349, 375, 383, 384; 800/8, 19, 21; According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/325, 349, 375, 383, 384; 800/8, 19, 21; Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BRS-WEST, MEDLINE, CABA, EMBASE, SCISEARCH, BIOSIS, CAPLUS search terms: primordial germ cells, pgcs, avian, chicken, turkey, gallinaea, culture, scf, igf, lif, bfgf				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	PAIN et al. Long-Term in vitro Culture and Characterisation of Avian Embryonic Stem Cells with Multiple Morphogenetic Potentialities. Development. August 1996, Vol. 122, pages 2339-2348, especially pages 2339, 2340, and 2343.	1-15, 17		
A	US 5,258,307 A (SIMKISS et al.) 02 November 1993, see entire document.	1-8		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="vertical-align: top;"> *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *A* document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *A* document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *A* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 21 OCTOBER 1999		Date of mailing of the international search report 05 NOV 1999		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer DEBORAH J. R. CLARK Telephone No. (703) 308-0196 JOYCE BRIDGERS PARALEGAL SPECIALIST CHEMICAL MATRICES 		

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 novembre 2001 (15.11.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/85938 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C12N 15/12, G01N

33/68, A01K 67/027, C07K 14/465, 16/18, A61K 39/395,
31/7088, 38/17, C12N 5/10, 15/63, C12Q 1/68

Valérie [FR/FR]; 12, rue Paul Bert, F-69003 Lyon (FR).
PAIN, Bertrand [FR/FR]; 4 Place Bir Hakeim, F-69003
Lyon (FR). SAMARUT, Jacques [FR/FR]; 169 bis, route
de Genas, F-69100 Villeurbanne (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR01/01207

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17
(FR).

(22) Date de dépôt international : 19 avril 2001 (19.04.2001)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

00/06029

11 mai 2000 (11.05.2000) FR

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US)
: INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147, rue de l'Université,
F-75007 Paris (FR). CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3,
rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). ENS
- ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON
[FR/FR]; 46, Allée d'Italie, F-69000 LYON (FR).

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
ACLOQUE, Hervé [FR/FR]; 87, rue André Bollier,
F-69007 Lyon (FR). BIROT, Anne-Marie [FR/FR]; 3, rue
du Planit, F-69110 Sainte-Foy-les-Lyon (FR). RISSON,

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abrégiactions" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: MODIFIED ES CELLS AND ES CELL-SPECIFIC GENE

(54) Titre : CELLULES ES MODIFIÉES ET GENE SPECIFIQUE DE CELLULES ES

(57) Abstract: The invention concerns modified avian ES cells, specifically expressing an exogenous gene when they have a pluripo-
tent character. The invention also concerns a nucleic acid and a polypeptide specifically expressed in pluripotent avian cells, and
methods for detecting the pluripotent character of cells using said nucleic acid and polypeptide.

(57) Abrégé : La présente invention concerne des cellules ES d'oiseau modifiées, exprimant spécifiquement un gène exogène
lorsqu'elles possèdent un caractère pluripotent. L'invention concerne également un acide nucléique et un polypeptide exprimés
spécifiquement dans les cellules d'oiseau pluripotentes, ainsi que des méthodes de détection du caractère pluripotent de cellules
mettant en oeuvre ces acides nucléiques et polypeptide.

WO 01/85938 A1

CELLULES ES MODIFIEES ET GENE SPECIFIQUE DE CELLULES ES

La présente invention concerne des cellules ES d'oiseau modifiées,
5 exprimant spécifiquement un gène exogène lorsqu'elles possèdent un caractère pluripotent. L'invention concerne également un acide nucléique et un polypeptide exprimés spécifiquement dans les cellules d'oiseau pluripotentes, ainsi que des méthodes de détection du caractère pluripotent de cellules mettant en œuvre ces acide nucléique et polypeptide.

10 Les cellules ES sont des cellules pluripotentes isolées d'embryon très précoce, qui sont capables de participer à la morphogenèse de tous les tissus incluant le tissu germinale, après leur transplantation dans des embryons hôtes. Ces cellules ont d'abord été isolées chez la souris où elles sont très largement utilisées pour la création d'animaux mutants portant des modifications très ciblées de leur
15 génome. Des cellules ES ont été isolées et caractérisées chez les oiseaux (Pain et col. 1996). Ces cellules peuvent être utilisées pour modifier le patrimoine génétique du poulet (Etches et al. 1996, Pain et col. 1999). Un milieu de culture permettant de maintenir le caractère pluripotent de ces cellules d'oiseaux a fait l'objet de la demande de brevet WO 96/12793.

20 La difficulté rencontrée par tous ceux qui veulent isoler des cellules ES en culture, concerne l'identification rapide de ces cellules et de leur caractère pluripotent. Plusieurs marqueurs cellulaires ont été utilisés comme l'expression d'une activité phosphatase alcaline (Strickland et col. 1980), l'expression d'épitopes antigéniques (Kemler et col. 1981, Solter et Knowles 1978), l'expression de
25 protéines spécifiques comme OCT-3 (Rosner et col. 1990), l'expression d'une activité télomérase (Prowse et Greider 1995). Les protéines OCT-3, REX-1, UTF-1 entre autres n'ont été identifiées jusqu'à présent que chez la souris. La vérification ultime du caractère pluripotent repose sur l'analyse des potentialités morphogénétiques de ces cellules après leur greffe dans des embryons hôtes, ce qui
30 représente un test très lourd.

Une autre difficulté rencontrée avec la culture des cellules ES en culture comprend l'obtention de populations cellulaires d'un degré d'hétérogénéité faible et satisfaisant, et le problème du contrôle de la croissance en culture de cellules non-

pluripotentes. En effet, un problème particulier associé à la présence continue de certains types cellulaires différenciés, c'est-à-dire que ces cellules sont capables d'éliminer les cellules ES de la culture en induisant leur différenciation ou leur mort cellulaire programmée.

- 5 La présente invention se propose de simplifier l'identification du caractère pluripotent de cellules d'oiseaux en culture, par la divulgation d'une séquence nucléique (gène *ens-1*) exprimée spécifiquement et sélectivement par les cellules pluripotentes.

10 Ainsi, la présente invention a pour objet un acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléique choisie dans le groupe de séquences suivantes :

- a) SEQ ID N° 1, ou le fragment correspondant aux nucléotides 1409-2878 de SEQ ID N° 1 ;
- 15 b) la séquence d'un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs d'une séquence choisie parmi SEQ ID N° 1 en particulier le fragment correspondant aux nucléotides 3111-3670 de SEQ ID N° 1 ;
- 20 c) une séquence nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, après alignement optimal avec une séquence définie en a) ou b), ladite séquence n'étant pas définie par les nucléotides 2308-2927 ou 3094-3753 de SEQ ID N° 1 ;
- 25 d) une séquence nucléique s'hybridant dans des conditions de forte stringence avec une séquence nucléique définie en a) ou b) , ladite séquence n'étant pas définie par les nucléotides 2308-2927 ou 3094-3753 de SEQ ID N° 1 ;
- e) la séquence complémentaire ou la séquence d'ARN correspondant à une séquence telle que définie en a), b), c) ou d).

De préférence, la base présente en 2773 de SEQ ID N° 1 est un « t », le codon correspondant codant alors pour une thréonine.

- 30 La séquence d'acides nucléiques selon l'invention définie en c) présente un pourcentage d'identité d'au moins 80 % après alignement optimal avec une séquence telle que définie en a) ou b) ci-dessus, de préférence 90 %, de façon la

plus préférée 98 %. De préférence, la séquence définie en c), d) ou en e) est comparée à une des séquences définies en a).

Par acide nucléique, séquence nucléique ou d'acide nucléique, polynucléotide, oligonucléotide, séquence de polynucléotide, séquence
5 nucléotidique, termes qui seront employés indifféremment dans la présente description, on entend désigner un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique, comportant ou non des nucléotides non naturels, et pouvant correspondre aussi bien à un ADN double brin, un ADN simple brin que des produits de transcription
10 desdits ADNs. Ainsi, les séquences nucléiques selon l'invention englobent également les PNA (Peptid Nucleic Acid), ou analogues.

Il doit être compris que la présente invention ne concerne pas les séquences nucléotidiques dans leur environnement chromosomique naturel, c'est-à-dire à l'état naturel. Il s'agit de séquences qui ont été isolées et/ou purifiées, c'est-à-dire qu'elles
15 ont été prélevées directement ou indirectement, par exemple par copie, leur environnement ayant été au moins partiellement modifié. On entend ainsi également désigner les acides nucléiques obtenus par synthèse chimique.

Par « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés au sens de la présente invention, on entend désigner un
20 pourcentage de nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. On entend désigner par "meilleur alignement" ou "alignement optimal", l'alignement pour lequel le pourcentage d'identité déterminé
25 comme ci-après est le plus élevé. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison » pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement
30 optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981), au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Needleman et Wunsch (1970), au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988), au

moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI). Afin d'obtenir l'alignement optimal, on utilise de préférence le programme BLAST, avec la

5 matrice BLOSUM 62. On peut également utiliser les matrices PAM ou PAM250.

Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale, la séquence d'acides nucléiques ou d'acides aminés à comparer pouvant comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de

10 référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions comparées et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le

15 pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

Par séquences nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, après alignement optimal avec une séquence de référence, on entend désigner les séquences nucléiques présentant, par rapport à la séquence nucléique de référence, certaines

20 modifications comme en particulier une délétion, une troncation, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une substitution, notamment ponctuelle, et dont la séquence nucléique présente au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, d'identité après alignement optimal avec la séquence nucléique de référence. Il s'agit de préférence de séquences dont les séquences complémentaires

25 sont susceptibles de s'hybrider spécifiquement avec la séquence SEQ ID N° 1 de l'invention. De préférence, les conditions d'hybridation spécifiques ou de forte stringence seront telles qu'elles assurent au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 % d'identité après alignement optimal entre l'une des deux séquences et la séquence complémentaire de l'autre.

30 Une hybridation dans des conditions de forte stringence signifie que les conditions de température et de force ionique sont choisies de telle manière qu'elles permettent le maintien de l'hybridation entre deux fragments d'ADN complémentaires. A titre illustratif, des conditions de forte stringence de l'étape

d'hybridation aux fins de définir les fragments polynucléotidiques décrits ci-dessus, sont avantageusement les suivantes.

L'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN est réalisée en deux étapes : (1) préhybridation à 42°C pendant 3 heures en tampon phosphate (20 mM, pH 7,5) contenant 5 x SSC (1 x SSC correspond à une solution 0,15 M NaCl + 0,015 M citrate de sodium), 50 % de formamide, 7 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 10 x Denhardt's, 5 % de dextran sulfate et 1 % d'ADN de sperme de saumon ; (2) hybridation proprement dite pendant 20 heures à une température dépendant de la taille de la sonde (i.e. : 42°C, pour une sonde de taille > 100 nucléotides) suivie de 2 lavages de 20 minutes à 20°C en 2 x SSC + 2 % SDS, 1 lavage de 20 minutes à 20°C en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS. Le dernier lavage est pratiqué en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS pendant 30 minutes à 60°C pour une sonde de taille > 100 nucléotides. Les conditions d'hybridation de forte stringence décrites ci-dessus pour un polynucléotide de taille définie, peuvent être adaptées par l'homme du métier pour des oligonucléotides de taille plus grande ou plus petite, selon l'enseignement de Sambrook et al., 1989.

Parmi les séquences nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, après alignement optimal avec la séquence selon l'invention, on préfère également les séquences nucléiques variantes de SEQ ID N° 1, ou de ses fragments, c'est-à-dire l'ensemble des séquences nucléiques correspondant à des variants alléliques, c'est-à-dire des variations individuelles de la séquence SEQ ID N° 1. Ces séquences mutées naturelles correspondent à des polymorphismes présents chez les oiseaux, en particulier chez les galliformes. De préférence, la présente invention concerne les séquences nucléiques variantes dans lesquelles les mutations conduisent à une modification de la séquence d'acides aminés du polypeptide, ou de ses fragments, codés par la séquence normale de SEQ ID N° 1.

On entend également désigner par séquence nucléique variante tout ARN ou ADNc résultant d'une mutation et/ou variation d'un site d'épissage de la séquence nucléique génomique dont l'ADNc a pour séquence SEQ ID N° 1.

L'invention concerne de préférence un acide nucléique purifié ou isolé selon la présente invention, caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué de la

séquence SEQ ID N° 1, de sa séquence complémentaire ou de la séquence de l'ARN correspondant à SEQ ID N° 1.

De préférence, les fragments s'hybridant à l'acide nucléique selon l'invention, ou homologue audit acide nucléique ne sont pas définis par les nucléotides 2308-2927 ou 3094-3753 de SEQ ID N° 1, qui correspondent approximativement à des EST (numéros GenBank AJ397754 et AJ393785) qui ont été obtenues par séquençage systématique et sur lesquelles aucune donnée notamment fonctionnelle n'a été fournie. Pour cette raison, ces divulgations doivent être considérées comme des divulgations accidentelles.

Les amorces ou sondes, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence d'un acide nucléique selon l'invention, font également partie de l'invention.

Ainsi, la présente invention concerne également les amorces ou les sondes selon l'invention qui peuvent permettre en particulier de mettre en évidence ou de discriminer les séquences nucléiques variantes, ou d'identifier la séquence génomique du gène dont l'ADNc est représenté par SEQ ID N° 1, en utilisant notamment une méthode d'amplification telle que la méthode PCR, ou une méthode apparentée.

L'invention concerne également l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'invention comme sonde ou amorce, pour la détection, l'identification, le dosage et/ou l'amplification de séquences d'acide nucléique.

L'invention concerne également l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'invention comme oligonucléotide sens ou antisens.

Selon l'invention, les polynucléotides pouvant être utilisés comme sonde ou comme amorce dans des procédés de détection, d'identification, de dosage ou d'amplification de séquence nucléique, présentent une taille minimale de 15 bases, de préférence de 20 bases, ou mieux de 25 à 30 bases.

Les sondes et amorces selon l'invention peuvent être marquées directement ou indirectement par un composé radioactif ou non radioactif par des méthodes bien connues de l'homme du métier, afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable.

Les séquences de polynucléotides selon l'invention non marquées peuvent être utilisées directement comme sonde ou amorce.

Les séquences sont généralement marquées pour obtenir des séquences utilisables pour de nombreuses applications. Le marquage des amorces ou des sondes selon l'invention est réalisé par des éléments radioactifs ou par des
5 molécules non radioactives.

Parmi les isotopes radioactifs utilisés, on peut citer le ^{32}P , le ^{33}P , le ^{35}S , le ^3H ou le ^{125}I . Les entités non radioactives sont sélectionnées parmi les ligands tels la biotine, l'avidine, la streptavidine, la dioxygénine, les haptènes, les colorants, les
10 agents luminescents tels que les agents radioluminescents, chémoluminescents, bioluminescents, fluorescents, phosphorescents.

Les polynucléotides selon l'invention peuvent ainsi être utilisés comme amorce et/ou sonde dans des procédés mettant en oeuvre notamment la technique de PCR (amplification en chaîne par polymérase) (Rolfs et al., 1991). Cette technique
15 nécessite le choix de paires d'amorces oligonucléotidiques encadrant le fragment qui doit être amplifié. On peut, par exemple, se référer à la technique décrite dans le brevet américain U.S. N° 4,683,202. Les fragments amplifiés peuvent être identifiés, par exemple après une électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide, ou après une technique chromatographique comme la filtration sur
20 gel ou la chromatographie échangeuse d'ions, puis séquencés. La spécificité de l'amplification peut être contrôlée en utilisant comme amorces les séquences nucléotidiques de polynucléotides de l'invention et comme matrices, des plasmides contenant ces séquences ou encore les produits d'amplification dérivés. Les fragments nucléotidiques amplifiés peuvent être utilisés comme réactifs dans des
25 réactions d'hybridation afin de mettre en évidence la présence, dans un échantillon biologique, d'un acide nucléique cible de séquence complémentaire à celle desdits fragments nucléotidiques amplifiés.

L'invention vise également les acides nucléiques susceptibles d'être obtenus par amplification à l'aide d'amorces selon l'invention.

30 D'autres techniques d'amplification de l'acide nucléique cible peuvent être avantageusement employées comme alternative à la PCR (PCR-like) à l'aide de couple d'amorces de séquences nucléotidiques selon l'invention. Par PCR-like on entend désigner toutes les méthodes mettant en oeuvre des reproductions directes ou

indirectes des séquences d'acides nucléiques, ou bien dans lesquelles les systèmes de marquage ont été amplifiés, ces techniques sont bien entendu connues. En général il s'agit de l'amplification de l'ADN par une polymérase ; lorsque l'échantillon d'origine est un ARN il convient préalablement d'effectuer une transcription reverse. Il existe actuellement de très nombreux procédés permettant cette amplification, comme par exemple la technique SDA (Strand Displacement Amplification) ou technique d'amplification à déplacement de brin (Walker et al., 1992), la technique TAS (Transcription-based Amplification System) décrite par Kwoh et al. (1989), la technique 3SR (Self-Sustained Sequence Replication) décrite par Guatelli et al. (1990), la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) décrite par Kievitis et al. (1991), la technique TMA (Transcription Mediated Amplification), la technique LCR (Ligase Chain Reaction) décrite par Landegren et al. (1988), la technique de RCR (Repair Chain Reaction) décrite par Segev (1992), la technique CPR (Cycling Probe Reaction) décrite par Duck et al. (1990), la technique d'amplification à la Q-béta-réplase décrite par Miele et al. (1983). Certaines de ces techniques ont depuis été perfectionnées.

Dans le cas où le polynucléotide cible à détecter est un ARNm, on utilise avantagusement, préalablement à la mise en oeuvre d'une réaction d'amplification à l'aide des amorces selon l'invention ou à la mise en oeuvre d'un procédé de détection à l'aide des sondes de l'invention, une enzyme de type transcriptase inverse afin d'obtenir un ADNc à partir de l'ARNm contenu dans l'échantillon biologique. L'ADNc obtenu servira alors de cible pour les amorces ou les sondes mises en oeuvre dans le procédé d'amplification ou de détection selon l'invention.

La technique d'hybridation de sondes peut être réalisée de manières diverses (Matthews et al., 1988). La méthode la plus générale consiste à immobiliser l'acide nucléique extrait des cellules de différents tissus ou de cellules en culture sur un support (tels que la nitrocellulose, le nylon, le polystyrène) et à incuber, dans des conditions bien définies, l'acide nucléique cible immobilisé avec la sonde. Après l'hybridation, l'excès de sonde est éliminé et les molécules hybrides formées sont détectées par la méthode appropriée (mesure de la radioactivité, de la fluorescence ou de l'activité enzymatique liée à la sonde).

Selon un autre mode de mise en oeuvre des sondes nucléiques selon l'invention, ces dernières peuvent être utilisées comme sondes de capture. Dans ce

cas, une sonde, dite « sonde de capture », est immobilisée sur un support et sert à capturer par hybridation spécifique l'acide nucléique cible obtenu à partir de l'échantillon biologique à tester et l'acide nucléique cible est ensuite détecté grâce à une seconde sonde, dite « sonde de détection », marquée par un élément facilement
5 détectable.

Parmi les fragments d'acides nucléiques intéressants, il faut ainsi citer en particulier les oligonucléotides anti-sens, c'est-à-dire dont la structure assure, par hybridation avec la séquence cible, une inhibition de l'expression du produit correspondant. Il faut également citer les oligonucléotides sens qui, par interaction
10 avec des protéines impliquées dans la régulation de l'expression du produit correspondant, induiront soit une inhibition, soit une activation de cette expression.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'acide nucléique selon l'invention code pour un polypeptide possédant un fragment continu d'au moins 200 acides aminés de la protéine SEQ ID N° 2, de préférence 300 acides
15 aminés, de la façon la plus préférée pour la protéine SEQ ID N° 2. Ce polypeptide est également un objet de l'invention.

En effet, la présente invention concerne également un polypeptide isolé caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :

- a) un polypeptide de séquence SEQ ID N° 2 ;
- 20 b) un polypeptide variant d'un polypeptide de séquence SEQ ID N° 2 ;
- c) un polypeptide homologue à un polypeptide défini en a) ou b), comportant au moins 80 % d'identité avec ledit polypeptide de a) ;
- 25 d) un fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'un polypeptide défini en a) , b) ou c) ;
- e) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en a), b) ou c).

De préférence, l'acide aminé en position 455 est une thréonine.

30 Par « polypeptide », on entend, au sens de la présente invention, désigner des protéines ou des peptides.

Par « fragment biologiquement actif », on entend un fragment possédant la même activité biologique que le fragment peptidique dont il est déduit, de

préférence dans le même ordre de grandeur (à un facteur 10 près). Un fragment biologiquement actif de la protéine ENS-1 consiste donc en un polypeptide issu de SEQ ID N° 2 qui pourrait posséder également un rôle dans le caractère de pluripotence des cellules ES.

- 5 De préférence un polypeptide selon l'invention est un polypeptide constitué de la séquence SEQ ID N° 2 (correspondant à la protéine codée par le gène *ens-1*) ou d'une séquence possédant au moins 80 % d'identité avec SEQ ID N° 2 après alignement optimal.

- 10 La séquence du polypeptide présente un pourcentage d'identité d'au moins 80 % après alignement optimal avec la séquence SEQ ID N° 2, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %.

- Par polypeptide dont la séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, après alignement optimal avec une séquence de référence, on entend désigner les
15 polypeptides présentant certaines modifications par rapport au polypeptide de référence, comme en particulier une ou plusieurs délétions, troncations, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une ou plusieurs substitutions.

- Parmi les polypeptides dont la séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée
20 98 %, après alignement optimal avec la séquence SEQ ID N° 2 ou avec l'un de ses fragments selon l'invention, on préfère les polypeptides variants codés par les séquences nucléiques variantes telles que précédemment définies, en particulier les polypeptides dont la séquence d'acides aminés présente au moins une mutation correspondant notamment à une troncation, délétion, substitution et/ou addition d'au
25 moins un résidu d'acide aminé par rapport à la séquence SEQ ID N° 2 ou avec l'un de ses fragments, de manière plus préférée les polypeptides variants présentant une mutation liée à une perte de caractère pluripotent des cellules les contenant.

- La présente invention concerne également les vecteurs de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique ou codant pour un polypeptide selon
30 l'invention. Un tel vecteur peut également contenir les éléments nécessaires à l'expression et éventuellement à la sécrétion du polypeptide dans une cellule hôte. Une telle cellule hôte est également un objet de l'invention.

Les vecteurs caractérisés en ce qu'ils comportent une séquence de promoteur et/ou de régulateur selon l'invention, font également partie de l'invention.

Lesdits vecteurs comportent de préférence un promoteur, des signaux
5 d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Ils doivent pouvoir être maintenus de façon stable dans la cellule et peuvent éventuellement posséder des signaux particuliers spécifiant la sécrétion de la protéine traduite.

Ces différents signaux de contrôle sont choisis en fonction de l'hôte
10 cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences d'acide nucléique selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi.

Parmi les systèmes à réplication autonome, on utilise de préférence en fonction de la cellule hôte, des systèmes de type plasmidique ou viral, les vecteurs
15 viraux pouvant notamment être des adénovirus (Perricaudet et al., 1992), des rétrovirus, des lentivirus, des poxvirus ou des virus herpétiques (Epstein et al., 1992). L'homme du métier connaît les technologies utilisables pour chacun de ces systèmes.

Lorsque l'on souhaite l'intégration de la séquence dans les chromosomes de
20 la cellule hôte, on peut utiliser par exemple des systèmes de type plasmidique ou viral ; de tels virus sont, par exemple, les rétrovirus (Temin, 1986), ou les AAV (Carter, 1993).

Parmi les vecteurs non viraux, on préfère les polynucléotides nus tels que l'ADN nu ou l'ARN nu selon la technique développée par la société VICAL, les
25 chromosomes artificiels de bactérie (BAC, bacterial artificial chromosome), les chromosomes artificiels de levure (YAC, yeast artificial chromosome) pour l'expression dans la levure, les chromosomes artificiels de souris (MAC, mouse artificial chromosome) pour l'expression dans les cellules murines et de manière préférée les chromosomes artificiels d'homme (HAC, human artificial
30 chromosome) pour l'expression dans les cellules humaines.

Dans les cellules d'oiseaux, on pourra utiliser comme vecteur d'expression des rétrovirus, des adénovirus aviaires, des poxvirus ou bien de l'ADN introduit par transfection ou électroporation.

De tels vecteurs sont préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple la lipofection, l'électroporation, le choc thermique, la transformation après perméabilisation chimique de la membrane, la fusion cellulaire.

L'invention comprend en outre les cellules hôtes, notamment les cellules eucaryotes et procaryotes, transformées par les vecteurs selon l'invention ainsi que les animaux transgéniques, de préférence les oiseaux ou mammifères, excepté l'Homme, comprenant une desdites cellules transformées selon l'invention. En particulier, l'invention comprend les animaux comprenant le gène *ens-1* présentant des marqueurs génétiques insérés dans celui-ci.

Parmi les cellules utilisables aux sens de la présente invention, on peut citer les cellules bactériennes (Olins et Lee, 1993), mais aussi les cellules de levure (Buckholz, 1993), de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de mammifères (Edwards et Aruffo, 1993), et notamment les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO). On peut citer également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant par exemple en œuvre des baculovirus (Luckow, 1993). Un hôte cellulaire préféré pour l'expression des protéines de l'invention est constitué par les cellules COS.

Parmi les cellules d'oiseaux utilisables, on peut citer les cellules LMH d'hématome de poulet, les cellules immortalisées de caille QT6, les fibroblastes primaires ou immortalisés de poulet, de caille, de canard.

L'invention concerne également une cellule hôte contenant un acide nucléique selon l'invention, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule ES d'oiseau modifiée en outre par introduction d'un gène exogène, ledit gène exogène étant uniquement et spécifiquement exprimé lorsque ladite cellule est maintenue à l'état pluripotent. De façon préférée, ledit gène exogène est un gène rapporteur, choisi parmi lacZ, GFP, luciférase, ROSA- β -geo, un gène de résistance à un antibiotique en particulier les gènes de résistance à la néomycine, l'hygromycine, la phléomycine, la puromycine).

Ces cellules selon l'invention sont très utiles pour le criblage de composés permettant d'induire la différenciation de cellules pluripotentes, ou de milieu pour la culture de cellules tout en maintenant leur caractère pluripotent.

Une autre cellule hôte d'intérêt selon l'invention consiste en une cellule d'oiseau contenant un acide nucléique selon l'invention, modifiée en outre par introduction d'un acide nucléique exogène, ledit acide nucléique exogène étant intégré dans ledit acide nucléique selon l'invention. Selon un mode de réalisation
5 préférée de l'invention, ledit acide nucléique exogène est un gène d'intérêt thérapeutique, éventuellement précédé d'un promoteur spatio-temporelle et/ou de séquences terminatrices. Dans un autre mode de réalisation, ledit acide nucléique exogène est un marqueur génétique, qui peut être choisi parmi lacZ, GFP, phosphatase alcaline, thymidine kinase, gènes de résistance aux antibiotiques
10 (parmi lesquels néomycine, hygromycine, phléomycine, puromycine).

De façon préférée, les cellules d'oiseau hôtes précédemment décrites caractérisées en ce que ledit oiseau appartient à l'ordre des Galliformes, et est en particulier un poulet ou une caille.

Dans ce cas, on intègre ledit gène rapporteur sous le contrôle du promoteur
15 du gène *ens-1* et/ou on intègre ledit acide nucléique exogène (gène d'intérêt thérapeutique et/ou marqueur génétique) dans le gène *ens-1*.

On peut ainsi utiliser le promoteur identifié dans la présente demande, correspondant aux nucléotides 3111-3670 de SEQ ID N° 1. On peut également modifier ce promoteur, en réduisant le nombre de nucléotides, ou en en introduisant
20 de nouveaux, voire en effectuant des mutations sur certains nucléotides. L'homme du métier connaît les protocoles pour effectuer de telles modifications, ainsi que pour tester le promoteur ainsi obtenu pour l'expression dans les cellules souches pluripotentes. On a ainsi montré en particulier que l'on peut insérer une guanine en position 3654 de SEQ ID N° 1, sans perdre l'activité promotrice du fragment ainsi
25 modifié.

Ainsi, l'invention concerne aussi l'utilisation d'un acide nucléique correspondant aux nucléotides 3111-3670 de SEQ ID N° 1 en tant que promoteur d'un gène d'intérêt pour une expression spécifique dudit gène d'intérêt dans des cellules pluripotentes aviaires. Un gène d'intérêt est soit un gène marqueur
30 (luciférase, GFP, β -galactosidase...), soit peut être un gène codant pour une protéine telle un facteur de croissance, une cytokine, une protéine impliquée dans la reconnaissance immunitaire, une protéine à intérêt thérapeutique... Il est intéressant

de noter que la « TATA box » a également été identifiée, qui est un objet de l'invention, aux nucléotides 3645-3651 de SEQ ID N° 1.

Une cellule préférée selon l'invention est une cellule 9N2.5, déposée à la Collection Nationale de Culture des Microorganismes le 11 Mai 2000 sous le
5 numéro d'ordre I-2477.

Les cellules selon l'invention sont de préférence des cellules ES pluripotentes, mais il doit être compris que l'invention concerne aussi les cellules d'oiseau différenciées, dérivant d'une cellule ES selon l'invention. on peut en particulier effectuer la différenciation de ces cellules en utilisant de l'acide
10 rétinoïque, selon les enseignements de la demande de brevet WO.96/12793.

L'invention concerne également les animaux transgéniques qui contiennent une cellule selon l'invention. Parmi les animaux selon l'invention, on préfère les oiseaux, en particulier les membres de l'ordre des Galliformes. Ces oiseaux transgéniques seront particulièrement intéressants pour l'étude de modifications
15 dans le gène *ens-1* ou dans son promoteur.

On peut également introduire un acide nucléique selon l'invention dans des oiseaux et d'autres animaux tels que les rongeurs, en particulier les souris, les rats ou les lapins, afin d'exprimer un polypeptide selon l'invention.

Ces animaux transgéniques sont obtenus par exemple par recombinaison
20 homologue sur cellules souches embryonnaires, transfert de ces cellules souches à des embryons, sélection des chimères affectées au niveau des lignées reproductrices, et croissance desdites chimères. Ils peuvent aussi être obtenus par microinjection d'ADN nu dans l'ovocyte fécondé.

Les animaux transgéniques selon l'invention peuvent ainsi surexprimer le
25 gène codant pour la protéine selon l'invention, ou leur gène homologue, ou exprimer ledit gène dans lequel est introduite une mutation ou bien exprimer un transgène comportant des portions du gène *ens-1* associées à des séquences codantes destinées à produire une protéine.

Alternativement, les oiseaux transgéniques selon l'invention peuvent être
30 rendus déficients pour le gène codant pour le polypeptide de séquence SEQ ID N° 2, ou un gènes homologues, par inactivation à l'aide du système LOXP/CRE recombinase (Rohlmann et al., 1996) ou de tout autre système d'inactivation de l'expression de ce gène.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'invention pour la synthèse de polypeptides recombinants.

La méthode de production d'un polypeptide de l'invention sous forme recombinante, elle-même comprise dans la présente invention, se caractérise en ce
5 que l'on cultive les cellules transformées, notamment les cellules ou mammifères de la présente invention, dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant codé par une séquence d'acide nucléique selon l'invention, et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.

Les polypeptides recombinants, caractérisés en ce qu'ils sont susceptibles
10 d'être obtenus par ladite méthode de production, font également partie de l'invention.

Les polypeptides recombinants obtenus comme indiqué ci-dessus, peuvent aussi bien se présenter sous forme glycosylée que non glycosylée et peuvent présenter ou non la structure tertiaire naturelle.

15 Les séquences des polypeptides recombinants peuvent être également modifiées afin d'améliorer leur solubilité, en particulier dans les solvants aqueux.

De telles modifications sont connues de l'homme du métier comme par exemple la délétion de domaines hydrophobes ou la substitution d'acides aminés hydrophobes par des acides aminés hydrophiles.

20 Ces polypeptides peuvent être produits à partir des séquences d'acide nucléique définies ci-dessus, selon les techniques de production de polypeptides recombinants connues de l'homme du métier. Dans ce cas, la séquence d'acide nucléique utilisée est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire.

25 Un système efficace de production d'un polypeptide recombinant nécessite de disposer d'un vecteur et d'une cellule hôte selon l'invention.

Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réplication
30 et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

Les procédés utilisés pour la purification d'un polypeptide recombinant sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des

méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques, etc...

Les polypeptides selon la présente invention peuvent aussi être obtenus par
5 synthèse chimique en utilisant l'une des nombreuses synthèses peptidiques connues, par exemple les techniques mettant en œuvre des phases solides (voir notamment Stewart et al., 1984) ou des techniques utilisant des phases solides partielles, par condensation de fragments ou par une synthèse en solution classique.

Les polypeptides obtenus par synthèse chimique et pouvant comporter des
10 acides aminés non naturels correspondants sont également compris dans l'invention.

Les anticorps mono- ou polyclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'invention, font partie de l'invention.

15 Des anticorps polyclonaux spécifiques peuvent être obtenus à partir d'un sérum d'un animal immunisé contre les polypeptides selon l'invention, notamment produit par recombinaison génétique ou par synthèse peptidique, selon les modes opératoires usuels.

On note notamment l'intérêt d'anticorps reconnaissant de façon spécifique
20 certains polypeptides, variants, ou leurs fragments immunogènes, selon l'invention.

Les anticorps mono- ou polyclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement le polypeptide de séquence SEQ ID N° 2 sont particulièrement préférés.

25 Les anticorps monoclonaux spécifiques peuvent être obtenus selon la méthode classique de culture d'hybridomes décrite par Köhler et Milstein (1975).

Les anticorps selon l'invention sont, par exemple, des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab ou F(ab')₂. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués afin
30 d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable.

L'invention concerne également des méthodes pour la détection et/ou la purification d'un polypeptide selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles mettent en œuvre un anticorps selon l'invention.

L'invention comprend en outre des polypeptides purifiés, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par une méthode selon l'invention.

Par ailleurs, outre leur utilisation pour la purification des polypeptides, les anticorps de l'invention, en particulier les anticorps monoclonaux, peuvent également être utilisés pour la détection de ces polypeptides dans un échantillon biologique.

Ils constituent ainsi un moyen d'analyse immunocytochimique ou immunohistochimique de l'expression des polypeptides selon l'invention, notamment le polypeptide de séquence SEQ ID N° 2 ou l'un de ses variants, sur des coupes de tissus spécifiques, par exemple par immunofluorescence, marquage à l'or, immuno-conjugués enzymatiques.

Ils peuvent permettre notamment de mettre en évidence l'expression de ces polypeptides dans les tissus ou prélèvements biologiques.

Plus généralement, les anticorps de l'invention peuvent être avantageusement mis en œuvre dans toute situation où l'expression d'un polypeptide selon l'invention, normal ou muté, doit être observée.

Ainsi, un procédé de détection d'un polypeptide selon l'invention dans un échantillon biologique, comprenant les étapes de mise en contact de l'échantillon biologique avec un anticorps selon l'invention et de mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé est également un objet de l'invention, ainsi qu'une trousse permettant de mettre en œuvre un tel procédé. Une telle trousse contient en particulier :

- a) un anticorps monoclonal ou polyclonal selon l'invention ;
- b) éventuellement des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réaction immunologique ;
- c) les réactifs permettant la détection du complexe antigène-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

Ces anticorps peuvent être obtenus directement à partir de sérum humain, ou à partir d'animaux immunisés avec des polypeptides selon l'invention, puis « humanisés ».

Les anticorps selon l'invention sont très utiles pour déterminer la présence du polypeptide SEQ ID N° 2, et permettent ainsi de déterminer le caractère pluripotent d'une cellule ES d'oiseau.

Un procédé de détermination du caractère pluripotent d'une cellule ES d'oiseau, caractérisé en ce qu'on détermine la présence d'un produit d'expression du gène correspondant à SEQ ID N°1 ou de l'ARNm de SEQ ID N° 1 est également un objet l'invention.

5 En effet, l'invention divulgue la séquence du gène *ens-1*, qui est spécifiquement exprimé dans les cellules ES d'oiseau, en particulier des Galliformes, lorsque celles-ci sont pluripotentes. Les méthodes de détection de l'expression d'un gène appliquées à ce gène permettent donc de connaître rapidement la nature des cellules étudiées.

10 En particulier, comme écrit ci-dessus, on peut détecter le produit d'expression du gène, en utilisant par exemple des anticorps selon l'invention, par Western Blot ou d'autres méthodes décrites précédemment.

On peut aussi effectuer la détection de l'ARNm de SEQ ID N° 1 par Northern Blot ou par RT-PCR en utilisant une sonde ou des amorces selon
15 l'invention.

La détection de l'expression de ce gène peut également être effectuée en utilisant une puce à ADN ou une puce à protéine, qui contiennent respectivement un acide nucléique ou un polypeptide selon l'invention. De telles puces sont également objets de l'invention.

20 Une puce à protéines selon l'invention permet aussi l'étude des interactions entre les polypeptides selon l'invention et d'autres protéines ou des composés chimiques, et peut ainsi être utile pour le criblage de composés interagissant avec les polypeptides selon l'invention.

Les Demanderesses ont montré que le gène *ens-1* est trouvé
25 uniquement dans les oiseaux de la famille des Galliformes. Ainsi, l'invention concerne également un procédé de classification de l'appartenance d'un oiseau à l'ordre des Galliformes, caractérisé en ce que l'on détecte, dans le génome dudit oiseau, la présence d'un acide nucléique selon l'invention, en particulier la présence de SEQ ID N° 1.

30 Cette propriété que le gène *ens-1* soit trouvé uniquement chez les Galliformes permet de définir un procédé de détermination de la présence d'un échantillon provenant d'un oiseau de l'ordre des Galliformes dans un échantillon

alimentaire, caractérisé en ce que l'on détecte, dans ledit échantillon, la présence d'un acide nucléique selon l'invention, en particulier la présence de SEQ ID N° 1.

On peut détecter la présence d'un acide nucléique selon l'invention dans un échantillon biologique ou alimentaire, ou dans le génome d'un oiseau, par
5 différentes manières. En particulier, on peut définir un procédé de détection et/ou de dosage d'un acide nucléique selon l'invention dans un échantillon biologique, alimentaire caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact dudit échantillon avec un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 3, marqué ;
- 10 b) détection et/ou dosage de l'hybride formé entre ledit polynucléotide et l'acide nucléique dudit échantillon.

On peut également procéder à la détection et/ou au dosage d'un acide nucléique selon l'invention dans un échantillon biologique ou alimentaire, en effectuant une étape d'amplification des acides nucléiques dudit échantillon à l'aide
15 d'amorces choisies parmi les acides nucléiques selon l'invention.

Ainsi qu'il est démontré dans les exemples, l'acide nucléique selon l'invention ne sont exprimés dans les cellules ES d'oiseau que lorsque celles-ci possèdent un caractère pluripotent. Par ailleurs, les cellules ES modifiées selon l'invention, avec un gène rapporteur exprimé spécifiquement lorsqu'elles sont
20 pluripotente, et en particulier les cellules 9N2.5, peuvent être utilisés pour cribler des composés d'intérêt.

En particulier, elles peuvent être utilisées dans un procédé de criblage d'une substance ou d'un milieu capables d'induire une différenciation de cellules pluripotentes, caractérisé en ce que qu'il comprend les étapes suivantes :

- 25 a) maintien de cellules ES selon l'invention dans un milieu de culture permettant le maintien du phénotype pluripotent ;
- b) ajout de ladite substance dans ledit milieu de culture ou remplacement dudit milieu de culture par le milieu à tester ;
- c) détermination de l'induction de la différenciation par l'absence
30 d'expression de la protéine SEQ ID N° 2 ou du gène exogène.

Ce procédé est de préférence mis en œuvre avec des cellules ES modifiées par insertion d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène *ens-1*, et

l'on détecte l'absence d'expression dudit gène rapporteur. On utilise de préférence les cellules 9N2.5, et l'on détecte l'absence d'expression de la β -galactosidase.

On peut également utiliser les cellules selon l'invention pour cribler des substances capable de restaurer le caractère pluripotent de cellules différenciées, par
5 un procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) maintien de cellules différenciées dans un milieu de culture adéquat ;
- b) remplacement dudit milieu de culture par un milieu permettant de maintenir un phénotype pluripotent, et contenant ladite
10 substance à tester ;
- c) détermination de la restauration du caractère pluripotent desdites cellules par l'expression de la protéine SEQ ID N° 2 ou du gène exogène, dans lesdites cellules.

Ce procédé est de nouveau avantageusement mise en œuvre avec des
15 cellules différenciées selon l'invention, modifiées par insertion d'un gène rapporteur dans le gène *ens-1* ou sous contrôle de son promoteur. On utilise avantageusement des cellules 9N2.5 différenciées, qui permettent la détection de l'expression de la β -galactosidase.

Les procédés décrits ci-dessus sont également objets de l'invention, ainsi
20 que les milieux ou substances obtenus par lesdits procédés.

Une telle substance selon l'invention peut être un composé ayant une structure chimique (du type petite molécule organique), un lipide, un sucre, une protéine, un peptide, un composé hybride protéine-lipide, protéine-sucre, peptide-lipide, ou peptide-sucre, une protéine ou un peptide sur lequel on a ajouté des
25 ramifications chimiques.

Parmi les composés chimiques envisagés, ils peuvent contenir un ou plusieurs cycles, aromatique(s) ou non, ainsi que plusieurs résidus de toute sorte (notamment alkyle inférieur, c'est-à-dire présentant entre 1 à 6 atomes de carbones).

Il est extrêmement important de déterminer les gènes impliqués dans le
30 caractère de pluripotence des cellules ES, ou de bénéficier d'un marqueur dudit caractère. En effet, du fait de la capacité pour ces cellules de participer à la morphogenèse de tous les tissus, une modification génétique de celles-ci permet d'assurer que le caractère recherché se retrouvera dans tous les tissus de l'animal

formé. Par ailleurs, l'introduction de gènes exogènes au locus du gène *ens-1*, sous le contrôle de promoteurs à spécificité spatio-temporelle variables peut permettre l'obtention d'animaux transgéniques exprimant lesdits gènes dans des tissus ou à des stades de développement donnés. En effet, la spécificité du gène *ens-1* étant
5 qu'il ne s'exprime que si la cellule hôte possède le caractère pluripotent, l'introduction d'un acide nucléique exogène dans ce locus ne devrait pas gêner le développement de l'embryon.

On peut donc introduire des gènes d'intérêt thérapeutique, par exemple codant pour des protéines thérapeutiques (hormones, facteurs de croissance,
10 lymphokines), afin de pouvoir produire ces protéines lors du développement de l'embryon. Il peut en effet être très intéressant de produire des protéines thérapeutiques dans les œufs, dont la coquille assure un environnement stérile.

On peut également utiliser des cellules pluripotentes selon l'invention afin de les faire coloniser le tissu germinale d'animaux, en particulier d'oiseaux, de façon
15 plus préférée de l'ordre des Galliformes, afin que des caractères génétiques particuliers puissent être transmis à leur descendance. Ceci permet l'amélioration de races industrielles de poulets, dindes, cailles ou autres d'une façon particulièrement intéressante économiquement.

On peut aussi utiliser les composés choisis parmi

- 20 a) un acide nucléique selon l'invention ;
- b) un polypeptide selon l'invention ;
- c) un vecteur selon l'invention ;
- d) une cellule selon l'invention ;
- e) un anticorps selon l'invention ;
- 25 f) une substance selon l'invention,

à titre de médicament, afin de permettre, selon le cas, la restauration du caractère pluripotent de cellules d'oiseaux, ou au contraire d'induire la différenciation de cellules ES.

La présente invention ouvre donc la voie à une meilleure caractérisation du
30 caractère pluripotent des cellules ES, en fournissant la séquence d'un marqueur de ces cellules. Il reste toutefois à déterminer si ce gène est un facteur essentiel de ce caractère. Ainsi, l'introduction du gène *ens-1* dans des cellules différenciées, par exemple sur un plasmide sous le contrôle d'un promoteur adapté, et l'étude de la

restauration éventuelle du caractère pluripotent de ces cellules permettra de répondre à cette question. Parmi les promoteurs adaptés, on choisira un promoteur inductible, par exemple à un sucre, et l'on déterminera le caractère pluripotent des cellules lorsque l'on cesse d'induire l'expression du gène sur le plasmide. On peut également construire un plasmide qui mène à une excision du gène *ens-1* après un certain temps (par exemple en le plaçant entre deux séquences loxP, et en introduisant un second plasmide codant pour la recombinaise Cre). Pour déterminer le caractère pluripotent des cellules, il peut être avantageux d'utiliser les cellules 9N2.5 selon l'invention, et de rechercher l'expression de la β -galactosidase après introduction du plasmide codant pour *ens-1*.

S'il est possible de déterminer que le gène *ens-1* est inducteur du caractère pluripotent des cellules, on peut mettre en œuvre un procédé de restauration dudit caractère (également objet de l'invention), caractérisé en ce que l'on exprime le gène *ens-1* dans des cellules différenciées. On peut utiliser les méthodes décrites ci-dessus, en y apportant certaines améliorations connues de l'homme du métier.

Les exemples ci-dessous permettent d'illustrer l'invention, et ne doivent pas être considérés comme limitant l'invention.

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : structure du vecteur ROSA- β -geo utilisé pour transformer les cellules ES.

Figure 2 : analyse de l'expression du transcrit ROSA- β -geo par RT-PCR dans les cellules 9N2.5 lors de l'induction de la différenciation par l'acide rétinoïque (+RA), le DMSO (+DMSO) ou les deux simultanément (+RA+DMSO). Le milieu contrôle ne contient aucun facteur inducteur.

Figure 3 : analyse de l'expression du transcrit ROSA- β -geo par Northern Blot lors de l'induction de la différenciation par l'acide rétinoïque. Le Blot est hybridé avec une sonde LacZ.

Figure 4 : analyse de l'expression du transgène ROSA- β -geo par révélation de l'activité β -galactosidase dans des embryons chimères pour les cellules 9N2.5.

Figure 5 : analyse par PCR de la présence du transgène ROSA- β -geo dans les embryons chimères. De l'ADN a été extrait, soit de cellules 9N2.5, soit d'embryon chimère âgé de 48 heures ou de 4 jours, résultant de la transplantation de cellules 9N2.5, soit d'embryon contrôle de 48 heures ou 4 jours.

Figure 6 : détection par Southern Blot de la présence du transgène ROSA- β -geo dans l'ADN génomique des cellules 9N2.5 après digestion par *EcoRI* (E) ou *DraI* (D).

Figure 7 : détection par Northern Blot de la présence d'un transcrit comportant le transgène ROSA- β -geo, par hybridation avec une sonde Lac Z.

Figure 8 : A. analyse par Northern Blot de l'expression du gène *ens-1* dans des cellules ES normales de poulet et dans les cellules 9N2.5, après hybridation par les sondes C1, S1 et S2. B. structure de l'ADN complémentaire du gène *ens-1*. (RS = séquences répétées, ORF = cadre de lecture). Les flèches représentent les sondes C1, S1 et S2 utilisées pour l'hybridation.

Figure 9 : analyse par Northern Blot de l'expression des transcrits *ens-1* dans les cellules souches embryonnaires normales de poulet, dans les cellules 9N2.5, dans l'embryon de poulet à différents stades de développement et dans différents organes de poussin. Les ARN polyA+ isolés à partir des ARN totaux ont été hybridés sur les blots avec les sondes C1 ou S1, ou avec une sonde contrôle GAPDH.

Figure 10 : analyse de l'expression du transcrit *ens-1* dans l'embryon de poulet par hybridation *in situ*.

Figure 11 : Amplification par PCR réalisé sur l'ADN génomique de différentes espèces aviaires avec les amorces *ens1* S1 (SEQ ID N° 14) et *ens1* AS1 (SEQ ID N° 15).

Figure 12 : schéma de l'organisation des LTR de rétrovirus, de l'organisation attendue pour le gène *ens-1*, ainsi que des deux constructions utilisées pour l'identification du promoteur.

Figure 13 : Activité des promoteurs dans différentes lignées cellulaires (S : promoteur sens, AS : promoteur antisens)

Figure 14 : activité du promoteur 2 (figure 12) au cours de la différenciation des cellules ES.

EXEMPLES

Exemple 1 : Construction d'une cellule ES de poulet renfermant un marqueur génétique de la pluripotence.

Afin d'identifier un gène spécifiquement exprimé dans les cellules ES pluripotentes la stratégie dite de « piégeage de gène » (*gene trap*) a été suivie. Cette

stratégie consiste à introduire, dans le génome des cellules ES, un gène marqueur qui comporte une séquence codante exogène mais qui est dépourvu de promoteur propre. L'insertion aléatoire de ce marqueur dans le génome de la cellule conduira dans certains cas à placer ce gène exogène en aval d'un promoteur propre du
5 génome cellulaire. Le gène exogène adopte, dans cette configuration, une régulation d'expression très similaire sinon identique à celle du gène dans lequel il est inséré. Le suivi de l'expression du gène marqueur dans les cellules ainsi modifiées renseigne alors sur le patron d'expression du gène cellulaire ainsi « marqué ».

Comme système de piégeage de gène les inventeurs ont utilisé celui qui
10 exploite les propriétés du vecteur ROSA- β -geo décrit par Friedrich et Soriano (1991). Ce système est constitué d'un plasmide qui porte les deux gènes respectivement LacZ et Neo^R fusionnés l'un à l'autre dans l'ordre 5'-3'. Ce gène fusion code pour une protéine unique LacZ-Neo qui confère aux cellules qui la produisent à la fois la résistance au G418 et l'activité β -galactosidase. La structure
15 du plasmide est présentée sur la figure 1. Ce plasmide a été coupé par l'enzyme *DraI* qui induit sa linéarisation. Le plasmide linéarisé a été introduit dans des cellules ES de poulet par la technique d'électroporation. Pour cela une culture de cellules ES de poulet entretenue dans les conditions décrites dans Pain et col. (1996) a été utilisée. Les cellules ES furent recueillies à partir de boîtes de culture par
20 traitement ménagé à la pronase. Les cellules en suspension ont été lavées et mises en suspension dans du milieu de Glasgow à la concentration de 5×10^6 dans 0,8 ml. Dix microgrammes de plasmide linéarisé ont été ajoutés à la suspension cellulaire qui a été maintenue pendant 10 minutes à 4°C. Ensuite la suspension a été soumise à un traitement d'électroporation consistant en 2 stimulations électriques dans les
25 conditions suivantes: 280 V, 500 mF dans une cuve de 1 mm d'épaisseur dans un appareil *BioRad electroporator*. Les cellules ont ensuite été maintenues pendant 10 minutes à 4°C avant d'être ensemencées en culture selon le procédé décrit dans Pain et col. (1996), incorporé par référence. Trente six heures plus tard les cultures ont été additionnées de G418 à la concentration de 250 μ g/ml. Le milieu de culture
30 contenant le G418 a ensuite été changé tous les jours pendant 4 jours, puis tous les deux jours. Des clones de cellules ES résistantes au G418 sont devenus apparents après le sixième jour. Ils furent prélevés individuellement entre 8 et 10 jours après le début de la culture. Ces clones furent ensemencés individuellement dans du

milieu de culture frais contenant du G418 afin d'être amplifiés. Ils furent ensuite conservés dans de l'azote liquide.

Dans les cellules électroporées, l'expression du marqueur ROSA- β -geo a été analysée par l'identification *in situ* de l'activité β -galactosidase selon le procédé
5 suivant. Les cellules en suspension furent fixées à 4°C pendant une durée de 30 minutes dans un mélange à base de PBS contenant 1 % de formaldéhyde, 0,2 % de glutaraldéhyde et 0,02 % de Nonidet P-40. Les cellules furent ensuite incubées à 37°C pendant une durée qui pouvait aller de 1 à 24 heures dans du PBS contenant 1mg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopuranoside, 5 mM de
10 $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM de $K_4Fe(CN)_6$, 2 mM de $MgCl_2$ et 0,02 % de Nonidet P-40. Les cellules exprimant le marqueur β -galactosidase étaient colorées en bleu.

L'objectif était d'identifier des cellules ES dans lesquelles le vecteur ROSA- β -geo serait inséré en aval d'un promoteur qui ne fonctionnerait que dans les cellules ES lorsque celles-ci sont pluripotentes. Après caractérisation de plusieurs
15 clones, un clone a été retenu, appelé 9N2.5, qui ne présentait la réaction positive du test β -galactosidase que lorsque les cellules étaient maintenues dans les conditions de culture assurant la persistance du caractère pluripotent des cellules telles que décrites dans Pain et col. (1996). La positivité du test fut perdue lorsque les cellules 9N2.5 furent induites dans la différenciation (voir plus loin).

20 Le clone 9N2.5 a été amplifié en culture *in vitro* puis stocké sous forme viable par congélation dans l'azote liquide.

Exemple 2 : Caractérisation des cellules 9N2.5.

Les cellules 9N2.5 ont été maintenues dans les conditions de culture décrites
25 par Pain et col. (1996), pour les cellules ES de poulet. Dans ces conditions il a été vérifié que les cellules 9N2.5 présentaient la morphologie, l'activité télomérase et les épitopes antigéniques caractéristiques des cellules ES de poulet tels que décrits par Pain et col.. Ces cellules sont également capables de former des corps embryoides, comme les cellules parentales. L'électroporation, la sélection dans le
30 G418 et l'amplification ultérieure de ces cellules n'avaient donc pas altéré leurs caractères de cellules ES.

Pour analyser l'expression du marqueur ROSA- β -geo dans les cellules différenciées, les cellules 9N2.5 furent induites dans la différenciation selon les procédés décrits dans Pain et al. Ces cellules furent cultivées en absence de cellules nourricières, en absence de LIF et de cytokines et en présence soit d'acide rétinolique à la concentration de 5×10^{-6} M, soit de DMSO à la concentration de 1 %. Dans certaines cultures, l'acide rétinolique et le DMSO furent ajoutés simultanément. Dans les milieux induisant la différenciation des cellules ES on a pu observer l'apparition de cellules différenciées identiques à celles qui furent décrites initialement par Pain et col. (1996) dans les mêmes conditions.

Après 4 jours de culture dans les milieux de différenciation, les cellules devinrent complètement négatives pour le test de l'activité β -galactosidase. Afin de confirmer l'absence d'expression du transgène ROSA- β -geo, son expression fut suivie soit par la recherche des ARNm LacZ par la technique de RT-PCR. Pour cela, les amorces SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 4 furent utilisées :

Comme il est montré sur la figure 2, la quantité d'ARN produite par le transgène ROSA- β -geo ne change pas durant 5 jours de culture des cellules dans le milieu de culture qui maintient la pluripotence (milieu ES). Par contre dans les milieux de culture de différenciation contenant soit l'acide rétinolique seul, soit le DMSO, soit l'acide rétinolique et le DMSO, la quantité d'ARNm ROSA- β -geo diminua très fortement après 4 jours de culture. Pour confirmation, les ARNm ROSA- β -geo furent aussi analysés par la technique de *Northern blot* en utilisant une sonde marquée spécifique de la séquence LacZ. Comme cela est montré dans la figure 3, en présence d'acide rétinolique, les ARNm LacZ devinrent quasiment indétectables après deux jours de culture alors que leur expression était maintenue dans le milieu de culture dépourvu d'acide rétinolique.

Conclusion

Les cellules 9N2.5 expriment sélectivement le transgène ROSA- β -geo lorsqu'elles sont maintenues à l'état pluripotent. L'expression du transgène cesse très rapidement après l'induction de la différenciation de ces cellules en culture.

Exemple 3 : Test de l'expression du transgène ROSA- β -geo dans les cellules 9N2.5 *in vivo*.

Afin d'analyser les potentialités de développement des cellules 9N2.5 et l'expression du transgène ROSA- β -geo dans un embryon *in vivo*, les cellules 9N2.5 ont été greffées dans des embryons de poulet au stade X selon l'échelle de Eyal-Giladi et Kochav (1976) (échelle E-G&K) selon le protocole décrit par Pain et col. (1996). La présence des descendants des cellules injectées a été recherchée dans les embryons à différents stades de développement après la greffe, par le test de la β -galactosidase. Comme cela est illustré sur la figure 4, des amas de cellules positives pour la β -galactosidase furent détectés dans l'épiblaste des embryons ayant atteint le stade XIII dans les embryons injectés. Ces cellules positives ne furent identifiées que dans l'épiblaste de l'aire pellucide. Plus tard au cours du développement, au stade de la gastrulation, stade 5 selon l'échelle de Hamburger et Hamilton (H&H), des cellules positives ne furent retrouvées que dans la ligne primitive et le croissant germinal extra-embryonnaire. Dans la ligne primitive, les cellules furent identifiées dans quelques amas pour la plupart localisés dans le nœud de Hensen. Au stade 13 (échelle H&H), des cellules positives ne furent trouvées que dans le sinus rhomboidal qui correspond à la plaque neurale encore ouverte dans la partie caudale de l'embryon. Plus tard au cours du développement embryonnaire, des cellules positives n'ont été retrouvées que sous forme de très rares cellules isolées dans certains tissus d'origine nerveuse, ainsi que dans les ébauches gonadiques.

Afin de vérifier si, malgré la négativité de la réaction β -galactosidase, des descendants des cellules 9N2.5 avaient bien colonisé en nombre les tissus d'embryons âgés, la présence du transgène ROSA- β -geo a été recherchée par PCR dans de l'ADN extrait à partir d'embryon complet âgé de 2 ou 4 jours de développement. Comme cela est montré sur la figure 5, une bande caractéristique du transgène ROSA- β -geo a pu être détectée, démontrant que les cellules descendantes des cellules 9N2.5 greffées étaient présentes au moins 4 jours après la greffe.

Quelques embryons injectés avec des cellules 9N2.5 ont achevé leur développement et ont donné naissance à des poussins. La recherche des séquences du transgène ROSA- β -geo a été entreprise sur l'ADN isolé de divers tissus par la

technique de PCR. Ainsi chez deux poussins qui ont été analysés on a révélé la présence du transgène dans la peau, le gésier, le foie. Tous ces tissus ne présentaient pas d'activité β -galactosidase ce qui démontre que les transgènes étaient présents dans des cellules différenciées issues des cellules 9N2.5 greffées.

5 Conclusion

Les cellules 9N2.5 sont donc capables de coloniser un embryon hôte et de s'y développer. Cependant l'expression du transgène ROSA- β -geo reste limitée aux cellules très tôt après la transplantation dans l'embryon ainsi qu'à de rares cellules présentent dans quelques tissus comme les gonades ou le système nerveux. Compte
10 tenu des observations effectuées sur les cellules 9N2.5 en culture, on peut raisonnablement imaginer que l'expression du transgène ROSA- β -geo dans les cellules *in vivo* se limite aux cellules qui ne se sont pas encore engagées dans la différenciation.

L'ensemble de ces données obtenues *in vitro* et *in vivo* à partir des cellules
15 9N2.5 conduit à supposer que le transgène ROSA- β -geo est inséré dans un locus du génome de ces cellules dont l'activité transcriptionnelle est spécifique des cellules ES à l'état pluripotent.

Exemple 4 : Prolifération des cellules 9N2-5 *in vivo*.

20 Afin d'analyser si les cellules 9N2.5 étaient capables de proliférer dans certains compartiments de l'embryon, deux embryons injectés ont été prélevés après 7 jours d'incubation. Les embryons ont été arbitrairement coupés en 3 parties : la tête, le tronc en incluant les ébauches des membres supérieurs, la queue en incluant les ébauches des membres inférieurs. Ces parties ont été dissociées dans la pronase
25 et la suspension cellulaire ensemencée en culture selon le procédé de culture décrit par Pain et col. (1996). Une sélection au G418 à 250 μ g/ml fut réalisée pendant 6 jours. Il apparut quelques foyers de cellules résistantes dans toutes les cultures, mais la fréquence de ces foyers étaient beaucoup plus élevée dans les cultures ensemencées à partir de la partie postérieure des embryons. Les cellules résistantes
30 au G418, issues de cette culture furent repiquées pour être amplifiées, 7 jours après l'ensemencement initial. Une partie de ces cultures parallèles fut testée positivement pour l'expression de l'activité β -galactosidase. Cette approche a

permis, pour un des 2 embryons testés, de maintenir, d'amplifier et même de congeler, sous forme viable, des cellules positives pour la β -galactosidase, résistantes au G418 et qui présentaient une morphologie identique à celle des cellules 9N2.5 injectées. Les cellules issues du deuxième embryon, bien que
5 positives pour l'activité β -galactosidase, n'ont proliféré que lentement et n'ont pas pu être suffisamment amplifiées.

Conclusion

Ces résultats montrent donc que certaines cellules 9N2.5 sont capables de se maintenir sous forme de cellules ES dans certaines régions de l'embryon. Ces
10 cellules correspondent vraisemblablement aux rares cellules positives pour la β -galactosidase identifiées sur les coupes d'embryons injectés avec les cellules 9N2.5 (voir ci-dessus). Au regard de leur localisation dans la partie postérieure de l'embryon, on peut suggérer que certaines des cellules qui conservent les caractères des cellules 9N2.5 *in vivo* correspondent à des cellules EG telles que décrites chez
15 la souris et chez l'homme (Matsui et al. 1992, Shambloott et al. 1998). Les cellules EG sont des cellules précurseurs des cellules germinales qui possèdent des propriétés de pluripotence et des caractères cytologiques très voisins de ceux des cellules ES.

20 Exemple 5 : Utilisation des cellules 9N2.5 pour un criblage de substances

Les cellules 9N2.5 présentent une expression de la β -galactosidase forte quand elles sont dans un état indifférencié. Cette expression est perdue lors d'une induction de différenciation. Cette propriété peut être mise à profit pour tester différentes molécules inductrices ou promotrices de la différenciation ou pour tester
25 des molécules non inductrices. Les cellules 9N2.5 peuvent ainsi être utilisées comme support de test pour identifier des lots de sérum appropriés à la culture de cellules ES ou bien à leur différenciation. Pour cela, les cellules sontensemencées dans un milieu identique à celui employé pour maintenir les cellules parentales. Dans ce milieu, le sérum de référence est remplacé par les différents sera à tester, à
30 différentes concentrations éventuellement. Les ensemencements sont réalisés à très faible densité (2×10^4 cellules par boîte de 35 mm) et les cellules cultivées pendant 4 jours. Les cellules sont alors fixées, colorées pour révéler l'activité β -

galactosidase et le nombre de foyers positifs estimé. Le nombre de foyers positifs est en relation directe avec la capacité du sérum à maintenir l'autorenouvellement des cellules ES. Cet exemple peut être étendu au test de substances diverses, naturelles ou de synthèse.

5 Conclusion

Les cellules 9N2.5 peuvent être utilisées pour cribler des substances sur leur aptitude à induire l'autorenouvellement ou bien la différenciation de cellules ES en culture.

10 Exemple 6 : Identification du locus d'intégration du transgène ROSA- β -geo dans les cellules ES 9N2.5

Dans une première approche vers l'identification du locus d'intégration du transgène ROSA- β -geo dans les cellules 9N2.5 une analyse de l'ADN génomique des cellules 9N2.5 par la technique de *Southern Blot* a été effectuée. L'ADN de
15 cellules 9N2.5 fut digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI* ou par l'enzyme *DraI* qui ne coupent chacune le transgène ROSA- β -geo qu'en un site unique. Après migration électrophorétique de l'ADN digéré, les filtres furent hybridés avec une sonde spécifique du fragment LacZ. Comme cela est montré sur la figure 6, une
20 seule bande a été identifiée dans ces conditions dans chacune des digestions pratiquées. Aucune bande ne fut identifiée dans l'ADN de cellules ES normales de poulet ne contenant pas le transgène ROSA- β -geo. Ces résultats démontraient que, dans les cellules 9N2.5, une seule copie du transgène ROSA- β -geo est intégrée.

Dans un second temps, la taille de l'ARNm transcrit à partir du transgène a été analysé. De l'ARN de cellules 9N2.5 a été analysé par *Northern blot* avec une
25 sonde LacZ. Comme cela est montré sur la figure 7, un seul transcrit de taille 4,7 kb a été révélé. Ce transcrit n'est pas présent dans l'ARN de cellules ES normales. Compte tenu de la longueur attendue de la séquence qui doit être transcrite dans le transgène ROSA- β -geo, soit 3,9 kb, on doit imaginer que le transcrit révélé dans les cellules 9N2.5 contient environ 0,8 kb de séquences issues du gène cellulaire dans
30 lequel est inséré le transgène. Ces séquences cellulaires peuvent se situer sur l'ARNm soit en 5', soit en 3', soit être réparties des deux côtés de la séquence transcrite du transgène ROSA- β -geo. Afin de les rechercher en région 5', la

technique 5'-RACE en utilisant le kit *Marathon* de la société Clontech a été mise en œuvre.

À partir d'ARN de cellules 9N2.5, un brin d'ADN complémentaire fut synthétisé en utilisant une amorce spécifique de la région LacZ, amorce de
5 séquence (SEQ ID N° 5).

Après synthèse du second brin complémentaire de ce premier brin, l'ADN complémentaire double brin fut lié à l'adaptateur fourni dans le kit *Marathon* dont la séquence est SEQ ID N° 6. L'ensemble de la séquence fusionnée fut ensuite amplifié par la technique de PCR en utilisant les amorces SEQ ID N° 7 et SEQ ID
10 N° 8.

L'amplification fut réalisée sur une machine 2400 *Perkin Elmer* dans les conditions suivantes: 94°C pendant 30 secondes, puis 5 cycles à 94°C de 5 secondes chacun, puis 4 minutes à 72°C, puis 5 cycles à 94°C de 5 secondes chacun, puis 4 minutes à 70°C, puis 25 cycles à 94°C de 5 secondes chacun, puis 4 minutes à
15 68°C. Un produit d'amplification de 400 paires de bases fut identifié. Ce fragment appelé F1 fut cloné dans un plasmide pour être amplifié, puis sa séquence exacte fut déterminée. Nous avons ensuite recherché des séquences situées en aval de la séquence F1 sur l'ARNm transcrit dans les cellules ES en utilisant la technique de RT-PCR. Pour cela de l'ARN de cellules ES normales fut utilisé comme matrice
20 pour synthétiser un ADN complémentaire par amorçage au moyen d'une amorce P3 de séquence SEQ ID N° 9.

L'ADN complémentaire monocaténaire fut ensuite amplifié par PCR au moyen des amorces SEQ ID N° 10 qui correspond à la séquence 5' du fragment initialement amplifié par la technique 5'-RACE, et SEQ ID N° 11.

25 Un fragment appelé C1 fut ainsi amplifié puis cloné dans un plasmide. La séquence exacte de C1 fut déterminée (SEQ ID N° 12).

Afin de confirmer que la séquence C1 est bien dans les ARNm qui portent aussi la séquence LacZ dans les cellules 9N2.5, une amplification par RT-PCR a été effectuée sur les ARNm issus de ces cellules en utilisant les amorces respectives P4
30 (SEQ ID N° 13), spécifique du fragment C1, et LacZB (SEQ ID N° 8), spécifique de la séquence LacZ.

Un fragment de 331 paires de bases fut identifié. La taille de ce fragment correspond à celle attendue ce qui indique que la séquence C1 et la séquence LacZ

se trouvent bien sur un même ARNm. La confirmation était ainsi apportée que la séquence C1 doit être spécifique du gène cellulaire dans lequel est inséré le transgène ROSA- β -geo. Ce gène a été appelé *ens-1* (embryonic normal stem cell gene).

5 Afin de vérifier que le gène *ens-1* produit bien un ARN messenger les ARN de cellules ES normales de poulet ont été analysés par la technique de *Northern blot* au moyen de la sonde C1. Comme cela est montré sur la figure 8.A, la sonde C1 identifie un ARN majeur de taille voisine de 4,7 kb ainsi que deux ARN très faiblement marqués d'environ 10 kb et 2 kb respectivement.

10 À partir de la séquence C1, le clonage de l'ARNm complet transcrit à partir du gène *ens-1* a été entrepris.

Pour cela une banque d'ADNc construite à partir d'ARN polyadénylés isolés de cellules ES de poulet a été criblée avec des sondes préparées à partir du fragment C1.

15 Un ADN complémentaire de 4,2 kpb a été isolé. Afin de vérifier si cet ADNc est bien représentatif de l'ARNm transcrit à partir du gène *ens-1*, deux sondes nucléotidiques ont été préparées, respectivement S1 et S2, correspondant à deux fragments différents de cet ADNc situés en aval de la séquence C1. Ces deux sondes ont été utilisées pour identifier, par la technique de *Northern blot*, les ARN
20 correspondants isolés de cellules ES normales de poulet. Comme cela est montré sur la figure 8.A, ces deux sondes identifient un ARN de taille voisine de 4,5 kb, identique à celle de l'ARN majoritaire identifié précédemment avec la sonde C1. Comme cela est montré plus loin le patron d'expression de cet ARN identifié avec
25 les deux sondes S1 et S2 est identique à celui de l'ARN majoritaire identifié avec la sonde C1 dans les cellules ES normales.

L'ensemble de ces données suggère très fortement que les sondes C1, S1 et S2 reconnaissent le même ARNm *ens-1* dans les cellules ES normales de poulet.

La séquence de l'ARNm *ens-1* est présentée dans SEQ ID N° 1, et la structure de l'ADNc est présentée dans la figure 8.B. L'analyse de cette séquence
30 révèle un cadre de lecture de grande longueur pouvant coder pour une protéine de 490 acides aminés dont la séquence est présentée par SEQ ID N° 2. Il est à noter que la séquence C1 est polymorphique et que celle obtenu à partir du clone

d'ADNc, et présentée dans SEQ ID N° 1, est légèrement différente de celle obtenue précédemment par 5'RACE (SEQ ID N° 12).

Afin de vérifier si le gène *ens-1* correspond bien au gène dans lequel est inséré le transgène ROSA- β -geo dans les cellules 9N2.5 le patron d'expression du gène *ens-1* au cours du développement embryonnaire du poulet et au cours de la différenciation des cellules ES de poulet en culture a été analysé en utilisant la technique de *Northern blot*.

Comme cela est montré dans la figure 9, la sonde C1 et la sonde S1 identifient le même ARN de 4,5 kb dans les ARN extraits d'embryon de poulet normal de 48 heures. L'intensité du signal diminue fortement dans les ARN extraits d'embryons plus âgés, comme les embryons de 3 jours et de 4 jours. Le signal disparaît dans les ARN extraits d'embryons âgés de 7 jours ou de 18 jours. Il est nul dans les ARN extraits de divers tissus de poussin comme le foie, le muscle, le gésier, le cerveau, le cœur, l'œil, l'os ou la peau.

Afin de déterminer plus précisément le patron d'expression du gène *ens-1* durant les premiers stades du développement de l'embryon de poulet, les ARNm *ens-1* ont été recherchés par la technique d'hybridation *in situ* sur embryon total. Les résultats sont présentés sur la figure 10. Un signal très fort fut observé dans l'aire pellucide d'embryon aux stade X et XIII (échelle E-G&K). Dans les embryons au stade 2 (échelle H&H), le signal ne fut trouvé que dans l'aire pellucide avec une forte dominance dans la région de la ligne primitive. Au stade 5 (échelle H&H) le signal fut retrouvé dans le nœud de Hensen et dans la région rostro-caudale de la ligne primitive, ainsi que sous une forme très prononcée dans le croissant germinale en position antérieure de l'embryon. À des stades plus avancés du développement embryonnaire, aucun signal significatif ne fut détecté. Les mêmes patrons d'expression furent observés avec les sondes C1 et S1.

Conclusion

Le gène *ens-1* présente une expression spécifique des cellules ES de poulet indifférenciées et des stades très précoces de l'embryogenèse. L'expression du gène devient très faible voire indétectable après l'achèvement de la gastrulation.

Le gène *ens-1* constitue donc un marqueur très spécifique des cellules embryonnaires indifférenciées, que ces cellules soient présentes dans l'embryon, ou qu'elles soient maintenues dans cet état en culture *in vitro*. Le gène *ens-1* est aussi

spécifique des cellules du croissant germinal et donc des cellules précurseurs des gamètes.

Exemple 7 : Conservation du gène *ens-1* au cours de l'évolution

- 5 Afin d'analyser le degré de conservation du gène *ens-1* au cours de l'évolution une sonde spécifique du gène *ens-1* de poulet a été utilisée pour hybrider de l'ADN génomique provenant de diverses espèces animales par la technique du southern blot (non montré). La technique d'amplification de séquence nucléique par PCR entre deux amorces spécifiques du gène *ens-1* (SEQ ID N° 14 et SEQ ID N° 10 15), en utilisant le protocole : 96°C 3 minutes, (96°C 30 s, 62°C 30s, 72°C 30s, 10 cycles), (96°C 30s, 57°C 30s, 72°C 30s, 10 cycles), (96°C 30s, 52°C 30s, 72°C 30s, 20 cycles), a également été utilisée. Les résultats présentés sur la figure 11 montrent que des séquences homologues sont retrouvées uniquement dans l'ordre des galliformes (poulet, caille, dinde, faisan, perdrix rouge, perdrix grise). Il est à noter 15 qu'aucune homologue à *ens-1* n'est trouvé chez les mammifères (non montré).

Exemple 8 : Identification dans le gène *ens-1* d'une séquence promoteur de transcription dont l'activité est spécifique des cellules souches embryonnaires.

- 20 Le gène *ens-1* a donc été identifié comme étant un gène spécifiquement exprimé dans les cellules souches embryonnaires de poulet.

- Une région promoteur dont l'activité transcriptionnelle est spécifique des cellules ES indifférenciées de poulet a été identifiée dans le gène *ens-1*. Les applications sont importantes car cela permet de disposer ainsi d'un outil génétique qui permettrait de cibler l'expression d'un transgène spécifiquement dans les cellules 25 souches embryonnaires et vraisemblablement aussi dans les embryons de poulet au stade précédent la gastrulation.

- La présence de séquences répétées aux extrémités du transcrit *ens-1* suggérerait que ces séquences soient apparentées aux séquences LTR (long terminal repeat) des rétrovirus. Les LTR de rétrovirus sont régionalisées en trois parties, 30 respectivement, U3, R et U5 (dans le sens 5'-3'). Dans le génome rétroviral, la région U3 est capable d'activer la transcription avec parfois un contrôle

tissu-spécifique. Dans les ARN messagers rétroviraux, une copie des séquences R-U5 se trouve en 5' et une copie des séquences U3-R se trouve en 3'.

Par analogie avec la structure des LTR de rétrovirus, les régions pouvant correspondre aux régions U3, R et U5 des rétrovirus ont été identifiées dans l'ARN
5 messager du gène *ens-1*. La séquence identifiée comme étant répétée aux deux extrémités du transcrit *ens-1* correspond à la région R et la séquence qui correspondrait à la région U3 se localise entre l'extrémité 3' de la séquence codante pour *ens-1* et l'extrémité 5' de R. (fig 12).

10 Pour tester l'activité promotrice des régions R et U3-R du gène *ens-1*, ces régions ont été clonées dans les deux orientations possibles, sens et antisens, en amont du gène rapporteur de la luciférase de luciole pour obtenir respectivement les vecteurs appelés promoteur 1 et promoteur 2, respectivement sens (S) et anti-sens (AS). (Fig 12). Ces constructions ont été transfectées dans différentes lignées
15 cellulaires, dont des cellules souches de poulet 9N2-5, avec pour contrôle interne d'efficacité de transfection, le vecteur pRL-CMV (Promega) contenant le gène de luciférase de la chenille Renilla sous le contrôle du promoteur du cytomegalovirus.

La transfection des divers vecteurs promoteur 1 et promoteur 2 dans les
20 cellules 9N2-5 et la mesure de l'activité luciférase normalisée grâce au contrôle interne ont permis d'identifier une activité transcriptionnelle de la région U3 du vecteur promoteur 2S dans les cellules souches embryonnaires de poulet (cellules 9N2-5) alors que la région R ne montre aucune activité significative (Fig 13). L'activité du promoteur est par contre très faible dans les différentes autres lignées
25 cellulaires testées (fibroblastes de caille Qt6, cellules épithéliales de caille QBr ou cellules épithéliales humaines). D'autre part le vecteur promoteur 2S a été transfecté dans des cellules souches embryonnaires 9N2-5 induites à se différencier par traitement à l'acide rétinoïque. La mesure de l'activité luciférase dans les cellules à différents temps après le traitement par l'acide rétinoïque montre que l'activité
30 transcriptionnelle du promoteur décroît au cours de la différenciation des cellules souches embryonnaires alors que l'activité du promoteur contrôle (CMV) reste forte. (Fig 14).

L'ensemble de ces résultats montre qu'il existe, en 3' de la séquence codante du gène *ens1*, une région dotée d'une activité promotrice de la transcription et que cette activité transcriptionnelle est spécifique des cellules souches embryonnaires de poulet indifférenciées.

5

En utilisant la technique 5' RACE sur le vecteur promoteur 2S il a été possible de déterminer un site initiateur de transcription sur la séquence de l'ADNc *ens-1* (SEQ ID N° 1), ainsi qu'une séquence de type promoteur TATA en amont de ce site initiateur de transcription. Le promoteur correspond aux nucléotides 3111-3670 de SEQ ID N° 1.

10

DEPOT DE MATERIEL BIOLOGIQUE

La lignée cellulaire 9N2.5 a été déposée le 11 Mai 2000 à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France, selon les dispositions du Traité de Budapest, sous le numéro d'ordre I-2477, et correspond à la lignée de cellules souches embryonnaires de poulet dans laquelle le transgène ROSA- β -geo linéarisé par *DraI* a été introduit par électroporation, et qui ont été isolées après sélection au G418, et pour leur activité β -galactosidase, ainsi que décrit dans l'exemple 1.

20

Les cellules utilisables pour cultiver les cellules 9N2.5 (fibroblastes de souris, STO) ont également été déposées à la CNCM le 11 Mai 2000, sous le numéro SH-2477.

Références

- 25 Buckholz, (1993), Curr. Op. Biotechnology 4, 538.
Carter, (1993) Curr. Op. Biotechnology 3, 533.
Duck et al. (1990), Biotechniques, 9, 142.
Edwards et Aruffo (1993), Curr. Op. Biotechnology, 4, 558.
Epstein (1992) Médecine/Sciences, 8, 902.
30 Etches et al. (1996). Science 76, 1075-1083.
Eyal-Giladi et Kovak (1976). Dev. Biol. 151, 575-585.
Freidrich et Soriano (1991). Genes & Development 5, 1513-1523.
Guatelli et al. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874.

- Kemler et al. (1981). *J. Embryol. Exp. Morph.* 64, 45-60.
- Kievitis et al. (1991), *J. Virol. Methods*, 35, 273.
- Köhler et Milstein. (1975) *Nature* 256, 495.
- Kwoh, et al. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1173.
- 5 Landegren et al. (1988) *Science* 241, 1077.
- Luckow (1993), *Curr. Op. Biotechnology* 4, 564.
- Matsui et al. (1992). *Cell* 70, 841-847.
- Mathews et al. (1988), *Anal. Biochem.*, 169, 1-25.
- Miele et al. (1983), *J. Mol. Biol.*, 171, 281.
- 10 Neddleman et Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48 : 443
- Olins et Lee (1993), *Curr. Op. Biotechnology* 4 : 520.
- Pain et al. (1996). *Development* 122, 2339-2348.
- Pain et al. (1999). *Cells Tissues Organs* 165, 212-219.
- Perricaudet et al. (1992). *La Recherche* 23 : 471.
- 15 Pearson et Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 2444
- Prowse et Greider (1995). *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 4818-4822.
- Rohlmann et al. (1996) *Nature Biotech.* 14 : 1562.
- Rolfs, A. et al. (1991), Berlin : Springer-Verlag.
- Rosner et al. (1990). *Nature* 354, 686-692.
- 20 Sambrook et al. (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
- Segev, (1992), Kessler C. Springer Verlag, Berlin, New-York, 197-205.
- Shamblott et al. (1998). *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13726-13731.
- Smith et Waterman (1981) *Ad. App. Math.* 2 : 482
- 25 Solter et Knowles (1978) *Proc Natl Acad Sci USA*. 75, 5565-5569.
- Stewart et Yound (1984), *Solid phase peptides synthesis*, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2^{ème} éd., (1984).
- Strickland et al. (1980). *Cell* 21, 347-355.
- Temin, (1986) *Retrovirus vectors for gene transfer*. In Kucherlapati R., ed. *Gene Transfer*, New York, Plenum Press, 149-187.
- 30 Walker (1992), *Nucleic Acids Res.* 20 : 1691.

Revendications

1. Acide nucléique purifié ou isolé, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléique choisie dans le groupe de séquences suivantes :
 - 5 a) SEQ ID N° 1, ou le fragment correspondant aux nucléotides 1409-2878 de SEQ ID N° 1 ;
 - b) la séquence d'un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs d'une séquence choisie parmi SEQ ID N° 1 en particulier le fragment correspondant aux nucléotides 3111-3670 de SEQ ID
 - 10 N° 1 ;
 - c) une séquence nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, après alignement optimal avec une séquence définie en a) ou b), ladite séquence n'étant pas définie par les nucléotides 2308-2927 ou 3094-3753 de SEQ ID N° 1 ;
 - 15 d) une séquence nucléique s'hybridant dans des conditions de forte stringence avec une séquence nucléique définie en a) ou b) , ladite séquence n'étant pas définie par les nucléotides 2308-2927 ou 3094-3753 de SEQ ID N° 1 ;
 - 20 e) la séquence complémentaire ou la séquence d'ARN correspondant à une séquence telle que définie en a), b), c) ou d).
2. Acide nucléique purifié ou isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué de SEQ ID N° 1, la séquence complémentaire ou la séquence d'ARN correspondant à une de ces séquences.
3. Acide nucléique purifié ou isolé caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide possédant un fragment continu d'au moins 200 acides aminés de la protéine
- 25 SEQ ID N° 2.
4. Polypeptide isolé caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :
 - a) un polypeptide correspondant à SEQ ID N° 2 ;
 - b) un polypeptide variant d'un polypeptide de séquence définie en
 - 30 a) ;
 - c) un polypeptide homologue à un polypeptide défini en a) ou b), comportant au moins 80 % d'homologie avec ledit polypeptide de a) ;

- d) un fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'un polypeptide défini en a), b) ou c) ;
 - e) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en a), b) ou c).
- 5 5. Polypeptide selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il est constitué d'une séquence choisie parmi SEQ ID N° 2, ou une séquence possédant au moins 80 % d'homologie avec cette séquence après alignement optimal.
6. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 ou codant pour un polypeptide selon l'une des
- 10 revendications 4 et 5.
7. Cellule hôte caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur selon la revendication 6.
8. Cellule hôte contenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule ES d'oiseau modifiée en outre par
- 15 introduction d'un gène exogène, ledit gène exogène étant uniquement et spécifiquement exprimé lorsque ladite cellule est maintenue à l'état pluripotent.
9. Cellule selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit gène exogène est un gène rapporteur.
10. Cellule selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit gène rapporteur est
- 20 choisi parmi lacZ, GFP, luciférase, ROSA- β -geo, un gène de résistance à un antibiotique.
11. Cellule hôte contenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule d'oiseau modifiée en outre par
- 25 introduction d'un acide nucléique exogène, ledit acide nucléique exogène étant intégré dans ledit acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3.
12. Cellule selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit acide nucléique exogène est un gène d'intérêt thérapeutique, éventuellement précédé d'un promoteur spatio-temporelle et/ou de séquences terminatrices.
13. Cellule selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit acide nucléique
- 30 exogène est un marqueur génétique.
14. Cellule selon l'une des revendications 8 à 13, caractérisée en ce que ledit oiseau appartient à l'ordre des Galliformes.

15. Cellule selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit oiseau est un poulet ou une caille.
16. Cellule selon l'une des revendications 14 et 15, caractérisée en ce que ledit gène rapporteur est intégré sous le contrôle du promoteur du gène *ens-1*.
- 5 17. Cellule selon l'une des revendications 14 et 15, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule 9N2.5, déposée à la Collection Nationale des Microorganismes le 11 Mai 2000 sous le numéro d'ordre I-2477.
18. Cellule d'oiseau différenciée, caractérisée en ce qu'elle dérive d'une cellule ES selon l'une des revendication 8 à 17.
- 10 19. Animal, excepté l'homme, caractérisé en ce qu'il comprend une cellule selon l'une des revendications 7 à 18.
20. Utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 en tant que sonde ou amorce, pour la détection et/ou l'amplification de séquences d'acide nucléique.
- 15 21. Utilisation d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 comme oligonucléotide sens ou antisens.
22. Utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 pour la production d'un polypeptide recombinant.
23. Procédé d'obtention d'un polypeptide recombinant caractérisé en ce que l'on cultive une cellule selon la revendication 7 dans des conditions permettant l'expression dudit polypeptide et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.
- 20 24. Polypeptide recombinant caractérisé en ce qu'il est obtenu par un procédé selon la revendication 23.
- 25 25. Anticorps monoclonal ou polyclonal caractérisé en ce qu'il lie sélectivement un polypeptide selon l'une des revendications 4, 5 ou 24.
26. Procédé de détection d'un polypeptide selon l'une des revendications 4, 5 ou 24, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
 - a) mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps
30 selon la revendication 25 ;
 - b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé.
27. Trousse de réactifs pour la mise en œuvre d'un procédé selon la revendication 26, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- a) un anticorps monoclonal ou polyclonal selon la revendication 25 ;
 - b) éventuellement des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réaction immunologique ;
 - 5 c) les réactifs permettant la détection du complexe antigène-anticorps produit lors de la réaction immunologique.
28. Procédé de détermination du caractère pluripotent d'une cellule ES d'oiseau, caractérisé en ce qu'on détermine la présence d'un produit d'expression du gène correspondant à SEQ ID N°1 ou de l'ARNm de SEQ ID N° 1.
- 10 29. Procédé selon la revendication 28, caractérisé en ce que la détection de l'ARNm de SEQ ID N° 1 s'effectue par Northern Blot ou par RT-PCR en utilisant une sonde ou des amorces, par une utilisation selon la revendication 20.
30. Procédé selon la revendication 28, caractérisé en ce que l'on détecte la présence de la protéine SEQ ID N° 2, par exemple en utilisant un anticorps selon la
- 15 revendication 25.
31. Procédé de classification de l'appartenance d'un oiseau à l'ordre des Galliformes, caractérisé en ce que l'on détecte, dans le génome dudit oiseau, la présence d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3.
32. Procédé de détermination de la présence d'un échantillon provenant d'un oiseau
- 20 de l'ordre des Galliformes dans un échantillon alimentaire, caractérisé en ce que l'on détecte, dans ledit échantillon, la présence d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3.
33. Puce à ADN caractérisée en ce qu'elle contient une séquence nucléique selon l'une des revendications 1 à 3.
- 25 34. Puce à protéines caractérisée en ce qu'elle contient un polypeptide selon l'une des revendications 4, 5 ou 24, ou un anticorps selon la revendication 25.
35. Procédé de détection et/ou de dosage d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 dans un échantillon biologique ou alimentaire, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 30 a) mise en contact dudit échantillon avec un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 3, marqué ;
- b) détection et/ou dosage de l'hybride formé entre ledit polynucléotide et l'acide nucléique dudit échantillon.

36. Procédé de détection et/ou de dosage d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 dans un échantillon biologique ou alimentaire, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'amplification des acides nucléiques dudit échantillon à l'aide d'amorces choisies parmi les acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 2.
37. Procédé de criblage d'une substance ou d'un milieu capables d'induire une différenciation de cellules pluripotentes, caractérisé en ce que qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) maintien de cellules ES selon l'une des revendications 7 à 17 dans un milieu de culture permettant le maintien du phénotype pluripotent ;
 - b) ajout de ladite substance dans ledit milieu de culture ou remplacement dudit milieu de culture par le milieu à tester ;
 - c) détermination de l'induction de la différenciation par l'absence d'expression de la protéine SEQ ID N° 2 ou du gène exogène.
38. Procédé selon la revendication 37, caractérisé en ce qu'il est effectué avec des cellules selon l'une des revendications 8 à 17.
39. Procédé selon la revendication 37 ou 38, caractérisée en ce que l'on utilise des cellules 9N2.5, et que l'on détecte l'absence d'expression de la β -galactosidase.
40. Procédé de criblage d'une substance capable de restaurer le caractère pluripotent de cellules différenciées, caractérisé en ce que qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) maintien de cellules différenciées dans un milieu de culture adéquat ;
 - b) remplacement dudit milieu de culture par un milieu permettant de maintenir un phénotype pluripotent, et contenant ladite substance à tester ;
 - c) détermination de la restauration du caractère pluripotent desdites cellules par l'expression de la protéine SEQ ID N° 2 ou du gène exogène, dans lesdites cellules.
41. Procédé selon la revendication 40, caractérisé en ce qu'il est effectué avec des cellules différenciées dérivant de cellules selon l'une des revendications 8 à 17.

42. Procédé selon la revendication 40 ou 41, caractérisée en ce que l'on utilise des cellules 9N2.5 différenciées, et que l'on détecte l'expression de la β -galactosidase.
43. Milieu ou substance caractérisé en ce qu'il est obtenu par un procédé selon l'une
5 des revendications 37 à 42.
44. Composé caractérisé en ce qu'il est choisi parmi
- a) un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 ;
 - b) un polypeptide selon l'une des revendications 4, 5 ou 24 ;
 - c) un vecteur selon la revendication 6 ;
 - 10 d) une cellule selon l'une des revendications 7 à 17 ;
 - e) un anticorps selon la revendication 25 ;
 - f) une substance selon la revendication 43,
- à titre de médicament.
45. Utilisation d'un acide nucléique correspondant aux nucléotides 3111-3670 de
15 SEQ ID N° 1 en tant que promoteur d'un gène d'intérêt pour une expression spécifique dudit gène d'intérêt dans des cellules pluripotentes aviaires.

1/15

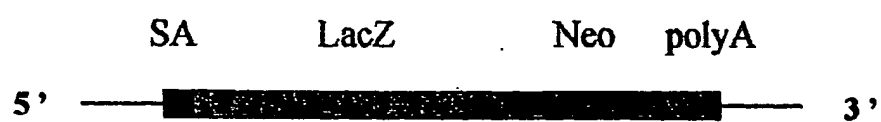


FIG.1

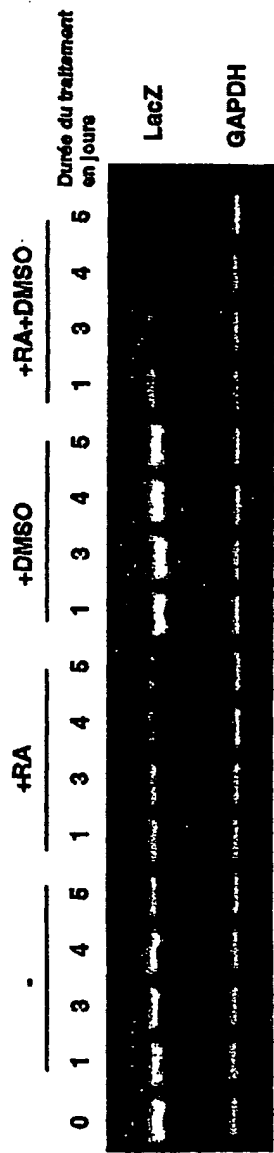


FIG.2

3/15

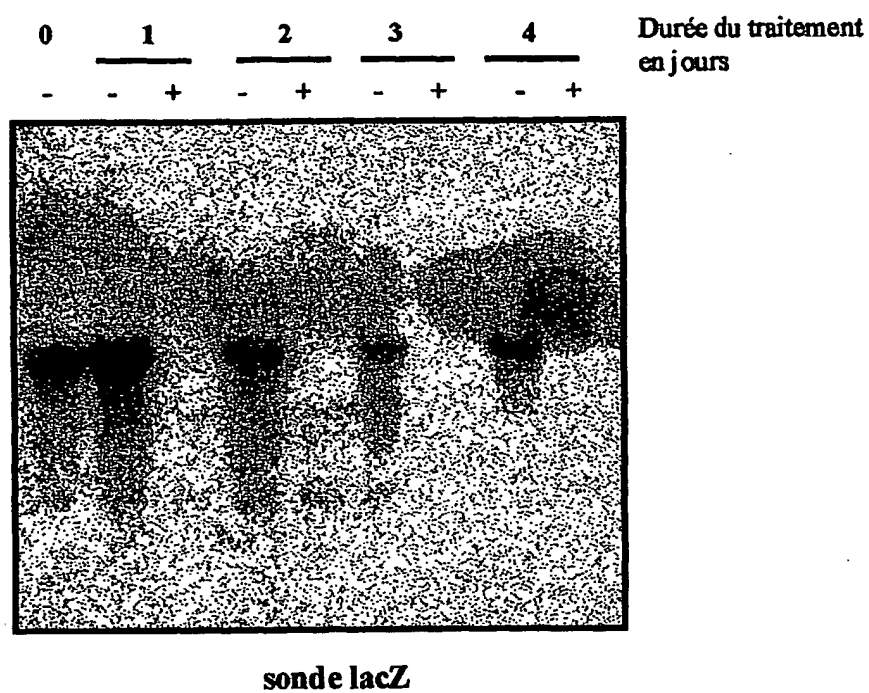
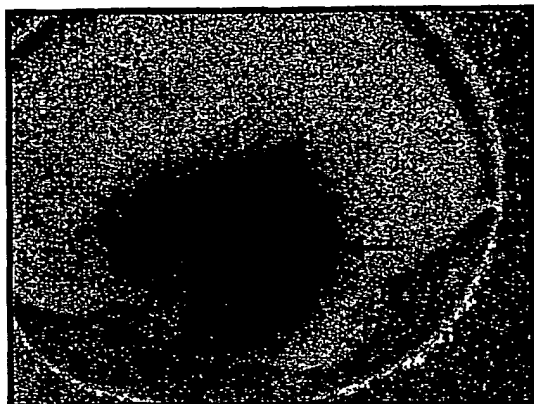


FIG.3

4/15



stage XIII



stage 5



stage 13

FIG.4

5/15

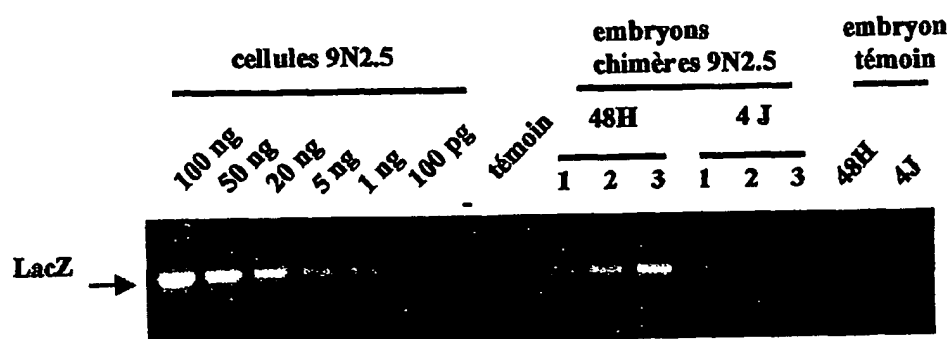


FIG.5

6/15

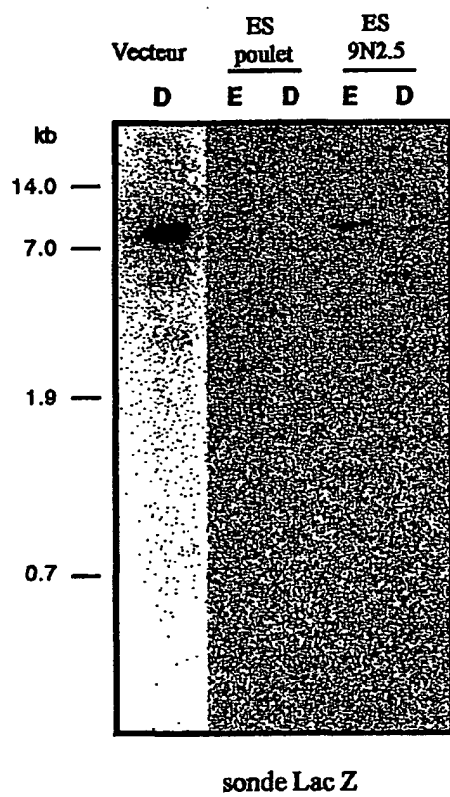
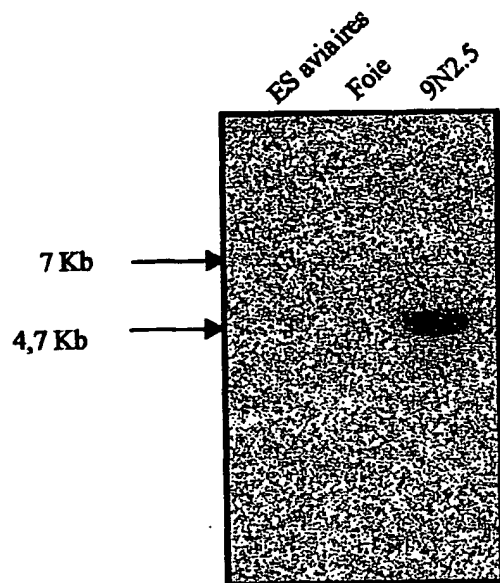


FIG.6

7/15



Hybridation avec une sonde LacZ

FIG.7

8/15

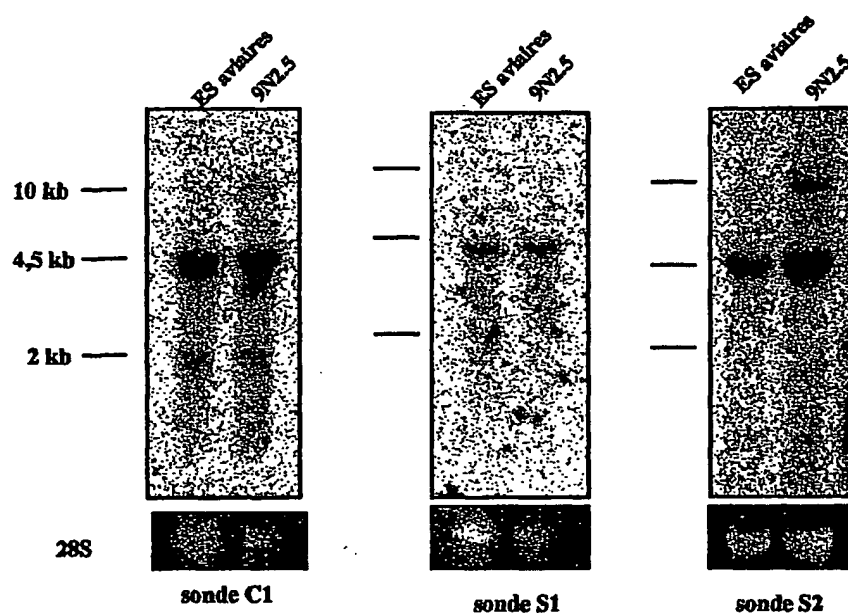
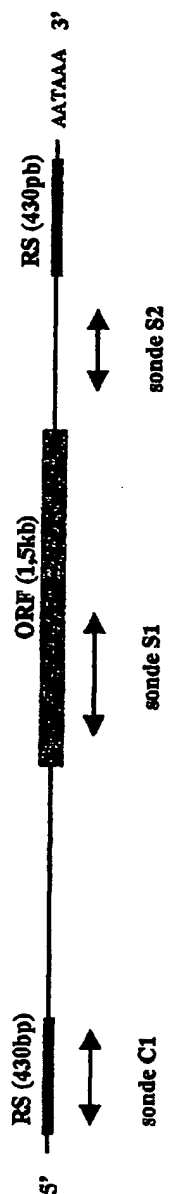


FIG.8A

9/15

FIG. 8B

10/15

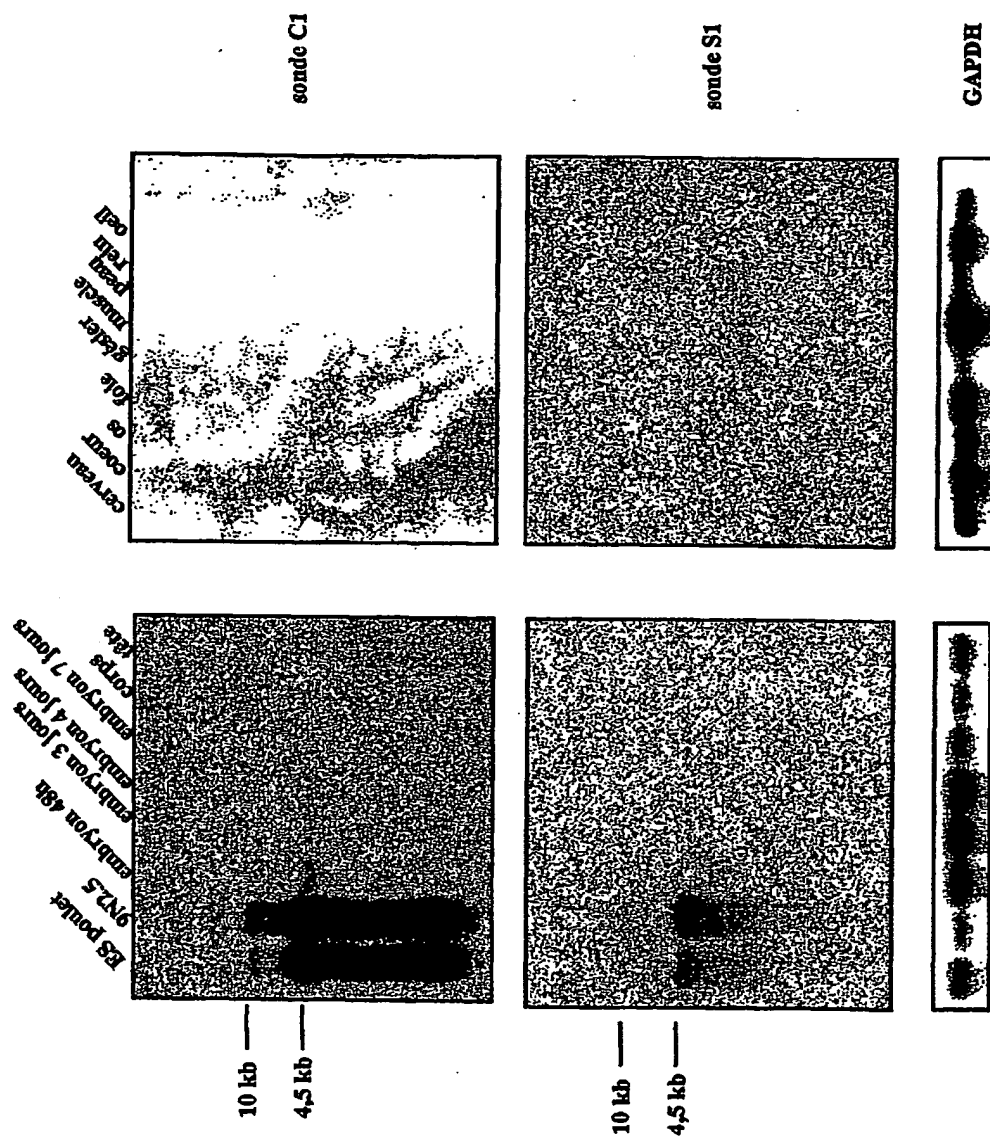
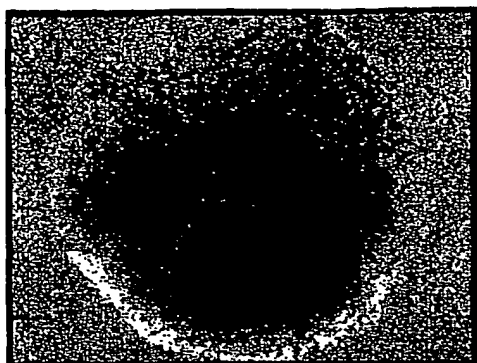
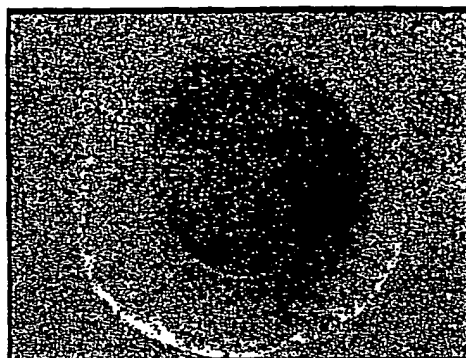


FIG. 9

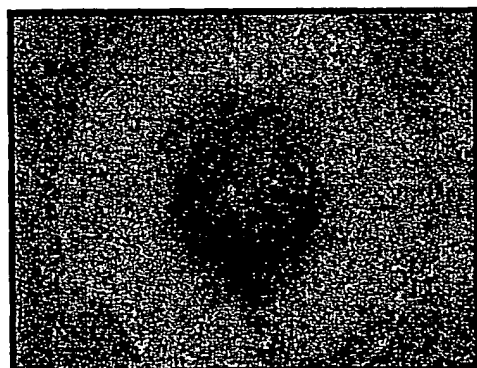
11/15



stage X
face supérieure



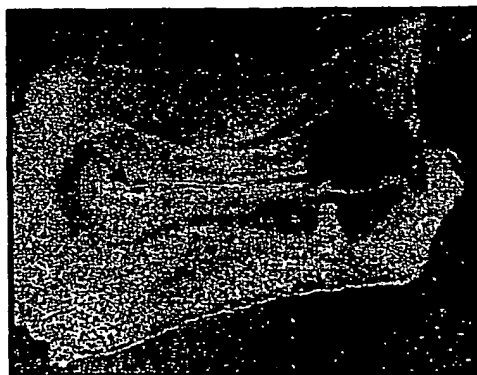
stade XIII
face supérieure



stade 2
face supérieure



stade 5
gastrulation



stade 10



stade 12

FIG.10

12/15

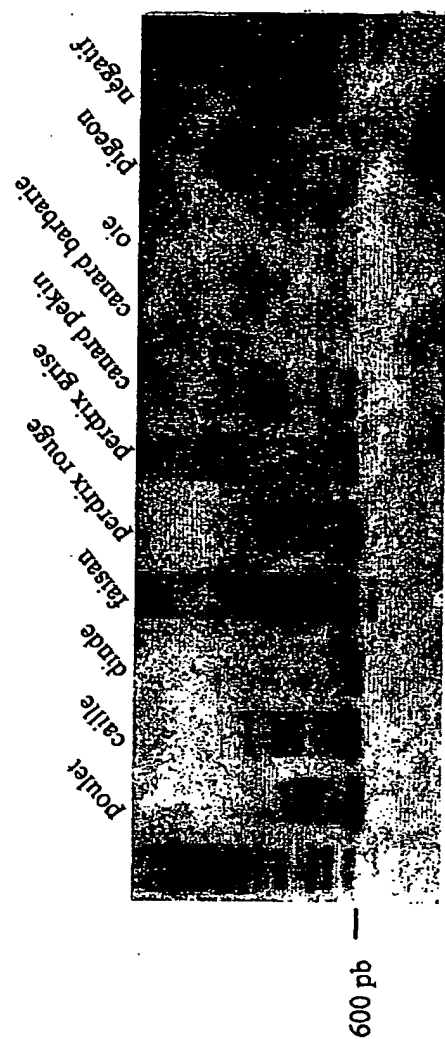


FIG.11

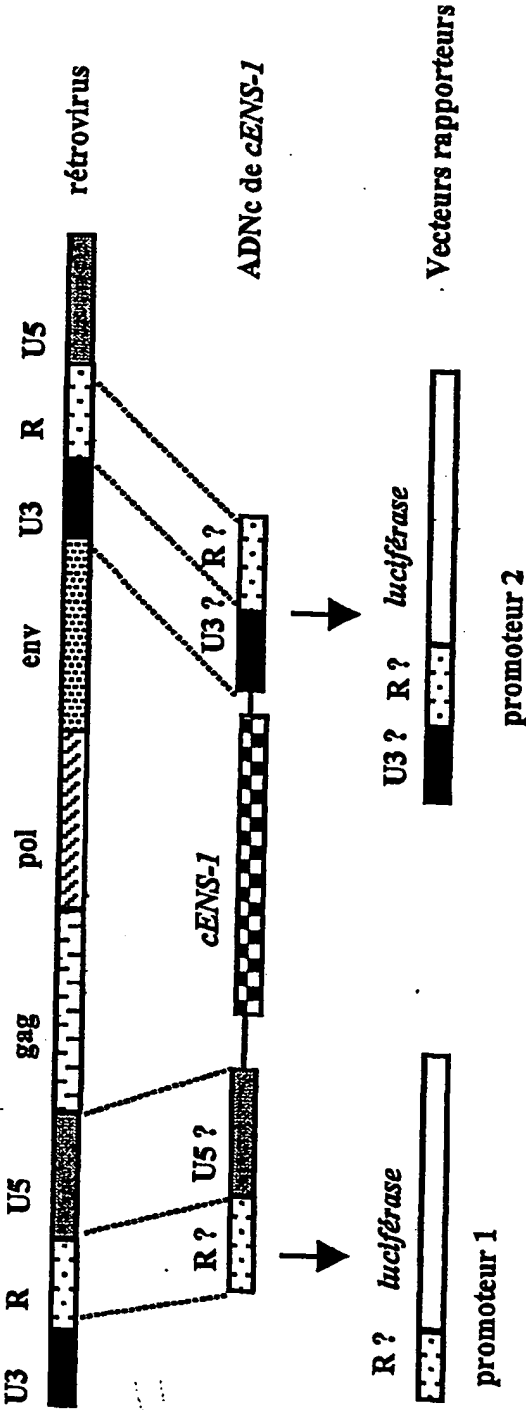


FIG.12

14/15

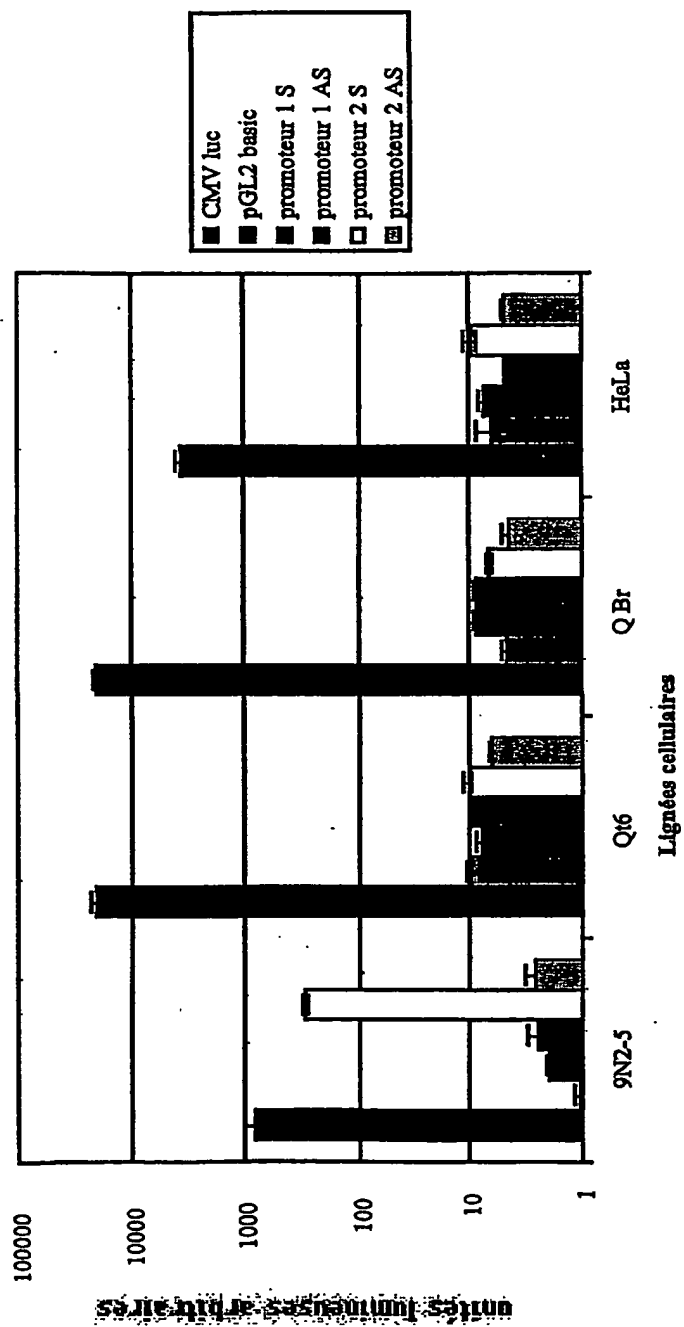


FIG.13

15/15

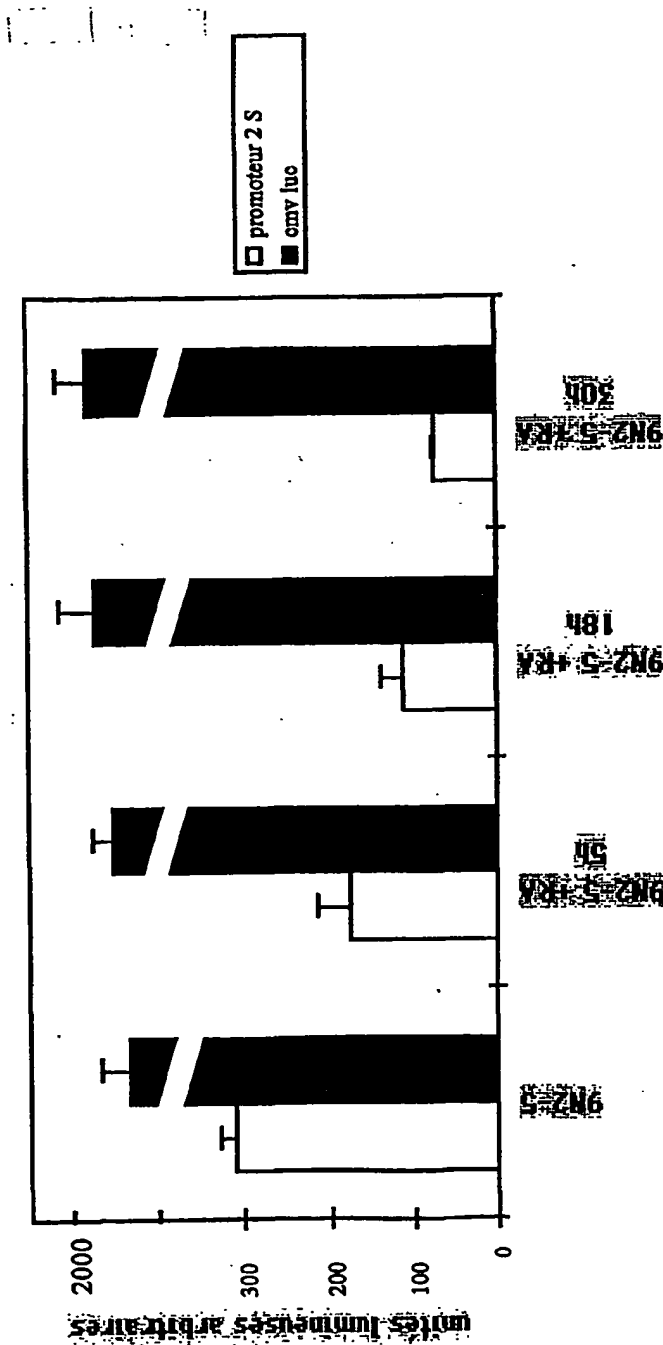


FIG.14

LISTE DE SÉQUENCES

<110> INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE AGRONOMIQUE - INRA
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS
ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE LYON - ENS LYON

<120> CELLULES ES MODIFIÉES ET GÈNE SPÉCIFIQUE DE CELLULES ES.

<130> D18898

<150> FR 00 06029

<151> 2000-05-11

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4177

<212> ADN

<213> Poulet

<220>

<221> CDS

<222> (1409)..(2881)

<400> 1

cgacagactt gaggggttct ctgccaaactg atctctcacc gcaatgggta gacggatctc 60
tacgtggaga ctgatctctc accacgacac gagcttctcg ccttcogac ctcctctacg 120
gaccgtttgc tgacggactt ccctgggcct gctacctgag acctgctgct tctccctga 180
cctgcatect ctctgtgccc cagaccggcc tcgctgtccc tgcccttcgg cctcggaccg 240
tcggaacatc gtgcaacggg actgtgtccg gatcctgggtg gtgactatcc ccgctttaacg 300
caattcttgc ctctttctat cttttctatc gctgccttc ccttccccat caccccaatc 360
cttaaatagc tccgtctccc cctttcccca tctcccttat taacatttgt aataaactgg 420
tcggaccaac atttgaaccg ctgtttctta atctcaagcc gggcatacat attcaaaga 480
acctcttctc cctcctataa attggagcga gacatttttt atggcgtagt cggcaggata 540
cccgcctga gagtggtgtc ctccagata atagtctgaa actttctgcg tgtacctcct 600
ggagttgcaa gaagcgatac ttcttgataa cttagacgtg agcacctctc caggaagatc 660
gcttcatact ctgaaacttt actatttatg tgtgtacctc tcgaggatgt atgaattttg 720
tctaattgta tttatttaat acgtgtgtgc ctctcggga agacctctct gcattttgtg 780
aaccctctc tacgtgtgcg cctcttgggg aagcaagata cacgtttttt gacttaaaaa 840
acttgtgtgc ctccaagaa gttttctcac tttgtgaaa attgtttatg tatgcacctc 900
tcgaggacgt atgaatcttg tctaattgca ttaatacgt gtgtgcctcc tcgggaagac 960
ctctctgcat tttgtgactt aaggatcttg caacttaagt gtgaaatttg aacctcttc 1020

Glu Tyr Thr Phe Asp Asn Ser Glu Asn Leu Asp Pro Gln Met Asn Val	
185 190 195 200	
aag gaa att ccc ttt tcg gcc act gaa ctg gcc aaa ctg aaa aag gat	2056
Lys Glu Ile Pro Phe Ser Ala Thr Glu Leu Ala Lys Leu Lys Lys Asp	
205 210 215	
ttc agt cgc tcc cca aag gag tct gaa aca gag tac gtc tgg aga gtt	2104
Phe Ser Arg Ser Pro Lys Glu Ser Glu Thr Glu Tyr Val Trp Arg Val	
220 225 230	
agt ctc act ggc gga gac cag atc cta cta aca gag aaa gaa gct gaa	2152
Ser Leu Thr Gly Gly Asp Gln Ile Leu Leu Thr Glu Lys Glu Ala Glu	
235 240 245	
ggt tac tgg gga cca gga gta ttt tta acc act ggc aat aat cgt gct	2200
Gly Tyr Trp Gly Pro Gly Val Phe Leu Thr Thr Gly Asn Asn Arg Ala	
250 255 260	
ccc tgg tcc tta aca cag agg gct gcc tat tgg gca ggg ggt ctc aac	2248
Pro Trp Ser Leu Thr Gln Arg Ala Ala Tyr Trp Ala Gly Gly Leu Asn	
265 270 275 280	
cct tta gaa agg ggg gac cct ctt gct att act gga act atc gac cag	2296
Pro Leu Glu Arg Gly Asp Pro Leu Ala Ile Thr Gly Thr Ile Asp Gln	
285 290 295	
tta gtg gag aat gtt cag aaa gct gct tgt ctc caa atg atg tat gat	2344
Leu Val Glu Asn Val Gln Lys Ala Ala Cys Leu Gln Met Met Tyr Asp	
300 305 310	
aga aag ttg cag cca cat aat gaa tca ccc atg atg tta cct gtt aat	2392
Arg Lys Leu Gln Pro His Asn Glu Ser Pro Met Met Leu Pro Val Asn	
315 320 325	
ccg gag aga ctg aca cct cta atc agg gga ctt cct gaa tcg tta aaa	2440
Pro Glu Arg Leu Thr Pro Leu Ile Arg Gly Leu Pro Glu Ser Leu Lys	
330 335 340	
cct ata ggt ata caa ctc caa gga aag ata caa gcc atg tct cag gga	2488
Pro Ile Gly Ile Gln Leu Gln Gly Lys Ile Gln Ala Met Ser Gln Gly	
345 350 355 360	
gag aga acc tgg gca gcg ttg gag gga tct gta gcc cct aac cac cag	2536
Glu Arg Thr Trp Ala Ala Leu Glu Gly Ser Val Ala Pro Asn His Gln	
365 370 375	
tca gga ccc aaa gtg tgg act tgg gga gag gtt gcc caa gaa tta att	2584
Ser Gly Pro Lys Val Trp Thr Trp Gly Glu Val Ala Gln Glu Leu Ile	
380 385 390	
aac tat gga aga aaa tat ggg ccg gtg gtt tct acc tgc agt aaa ttt	2632
Asn Tyr Gly Arg Lys Tyr Gly Pro Val Val Ser Thr Cys Ser Lys Phe	
395 400 405	
gag cca aga gga gta agg ctt gca gta gcc agc ctt gcc tcc agg cct	2680
Glu Pro Arg Gly Val Arg Leu Ala Val Ala Ser Leu Ala Ser Arg Pro	
410 415 420	
cct agc cca aga ctt att gga acc aaa aag gtt tca tcc coa gta aaa	2728
Pro Ser Pro Arg Leu Ile Gly Thr Lys Lys Val Ser Ser Pro Val Lys	

4

425	430	435	440	
acg ggg aca cga tgc att gat cat aaa cgc aat gga ctt tgg acn ctg	2776			
Thr Gly Thr Arg Cys Ile Asp His Lys Arg Asn Gly Leu Trp Xaa Leu				
445	450	455		
ggc tgg .aca aag ggt att cca cga gat ttg atg aat gga tta ccc aca	2824			
Gly Trp Thr Lys Gly Ile Pro Arg Asp Leu Met Asn Gly Leu Pro Thr				
460	465	470		
gtc aga tta gag aaa tta gtt aac tgc tgg cca gaa caa aag ctc aag	2872			
Val Arg Leu Glu Lys Leu Val Asn Cys Trp Pro Glu Gln Lys Leu Lys				
475	480	485		
ggg agc tga tgccttcgcc ccccccctccc aggtgagcgg gaggtgggtg	2921			
Gly Ser				
490				
gggggggtgaa ggggtggatgt ttattaggaa gctcacgact aaaggaaaca atctgttaat	2981			
tgtttattta ttattagtgg ttattgtcaa atgtacgggt gtctcttttc tctcttctat	3041			
tcattatgta atattcatgt taccactcct gaagaatcac ggggtggtgt ctatggcaag	3101			
ttgcattgtg tactgttgca actcttatgt ttgtatgatt ccatgtttta tacaagatgt	3161			
tgtatcccct atttactttg taaccaaacc tgaaaaatgt ttgtaatgat tgtatgaaac	3221			
atttgattcc acaacccttc cctcctttac ccttgtgctt gctatcttct ctcaccacca	3281			
tggatgccca gtgtccaatt tttaagcaac ctttgagtca cgggggtggtg taagagacta	3341			
ttcttttata tcattgactc aaagtttgct gaggaacaag tccaggcaag tcctgggcaa	3401			
aggcagagaa atcttttgtc ttgaggacac tgatggacag gtcctggcta aggattgtga	3461			
aatcctttaa ggagcacaga tggacaaggc caggggcac gagagagaga taagctgccg	3521			
ctaattggccg ggaacggtc tttttgtgtg gacttatctc aaggaaaatg gccatctcag	3581			
gaggtatgca caggactctt gctcaagccc ccaggaatgt cacgtaggca gcagaaaatg	3641			
gaggataaaa gaggtccaat aaccacaacg gtggaagctg atccttcacc acaaccacgg	3701			
caacgggaga ngcttatctc tcaccacgac agacttgagg ggttctctgc caactgatct	3761			
ctcaccgcaa tgggtagacg gatctctacg tggagactga tctctacca cgacacgagc	3821			
ttcctgoett ccgatcctcc totaoggacc gtttgetgat ggacttccct gggcctgcta	3881			
cctgagacct gctgcttccct ccctgacctg catcctctcg ctgcccaga ccggcctcgc	3941			
tgetcctgcc ctccgtcgg aacatcgtgc aacgggactg ctgccggatc ctgggtggtga	4001			
ctatccccgc ttaacgcaat tctngcctct ttctatcttt tntatcgctc gccttccctt	4061			
ccccatcacc ccaatcctta atagegtccg tcttccctt tccccatctc ccttattaac	4121			
at ttgttaata aactggtcgg accaacaataa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa	4177			

<210> 2
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> Poulet

<400> 2

```

Met Ser Asn Ser Met Ala Ser Met Lys Ser Glu Asp Val Leu Phe Asp
 1          5          10          15
Leu Leu Glu Lys His Gly Ala Arg Pro Ser Val Ser Gly Val Asp Trp
 20          25          30
Ala Arg Gln Asn Trp Tyr Asn Leu Gln Ser Val Ser Asp Arg Ile Arg
 35          40          45
Val Leu Gln Asn Glu Ala Arg Thr Arg Ala Gly Lys Gly Lys Ser Phe
 50          55          60
Ile Cys Ala Val Leu Gly Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Glu Phe Arg
 65          70          75          80
Glu Glu Lys Asn Ser Thr Glu Thr Gln Ser Ile Gln Ala Leu Gln Glu
 85          90          95
Ser Val Lys Val Thr Gln Glu Leu Val Lys Ser Leu Gln Ser Gln Ile
100          105          110
Arg Ser Leu Glu Asp Gln Leu Glu Arg Glu Lys His Asn Ser Val Leu
115          120          125
Leu Gln Thr Ala Phe Lys Glu Leu Ile Thr Cys Lys Asp Thr Gly Asp
130          135          140
Thr Val Ile His Ser Ala Pro Gln Glu Lys Val Tyr Pro Gln Gly Lys
145          150          155          160
Leu Gln Glu Val Lys Glu Arg Leu Asp Lys Leu Glu Ala Ser Pro Ala
165          170          175
His Ile Arg Pro Leu Ile Lys Thr Glu Tyr Thr Phe Asp Asn Ser Glu
180          185          190
Asn Leu Asp Pro Gln Met Asn Val Lys Glu Ile Pro Phe Ser Ala Thr
195          200          205
Glu Leu Ala Lys Leu Lys Lys Asp Phe Ser Arg Ser Pro Lys Glu Ser
210          215          220
Glu Thr Glu Tyr Val Trp Arg Val Ser Leu Thr Gly Gly Asp Gln Ile
225          230          235          240
Leu Leu Thr Glu Lys Glu Ala Glu Gly Tyr Trp Gly Pro Gly Val Phe
245          250          255
Leu Thr Thr Gly Asn Asn Arg Ala Pro Trp Ser Leu Thr Gln Arg Ala
260          265          270
Ala Tyr Trp Ala Gly Gly Leu Asn Pro Leu Glu Arg Gly Asp Pro Leu
275          280          285
Ala Ile Thr Gly Thr Ile Asp Gln Leu Val Glu Asn Val Gln Lys Ala
290          295          300
Ala Cys Leu Gln Met Met Tyr Asp Arg Lys Leu Gln Pro His Asn Glu
305          310          315          320
Ser Pro Met Met Leu Pro Val Asn Pro Glu Arg Leu Thr Pro Leu Ile
325          330          335
Arg Gly Leu Pro Glu Ser Leu Lys Pro Ile Gly Ile Gln Leu Gln Gly
340          345          350
Lys Ile Gln Ala Met Ser Gln Gly Glu Arg Thr Trp Ala Ala Leu Glu
355          360          365
Gly Ser Val Ala Pro Asn His Gln Ser Gly Pro Lys Val Trp Thr Trp
370          375          380
Gly Glu Val Ala Gln Glu Leu Ile Asn Tyr Gly Arg Lys Tyr Gly Pro
385          390          395          400
Val Val Ser Thr Cys Ser Lys Phe Glu Pro Arg Gly Val Arg Leu Ala
405          410          415
Val Ala Ser Leu Ala Ser Arg Pro Pro Ser Pro Arg Leu Ile Gly Thr
420          425          430
Lys Lys Val Ser Ser Pro Val Lys Thr Gly Thr Arg Cys Ile Asp His

```

Lys	Arg	Asn	Gly	Leu	Trp	Xaa	Leu	Gly	Trp	Thr	Lys	Gly	Ile	Pro	Arg		
	450					455					460						
Asp	Leu	Met	Asn	Gly	Leu	Pro	Thr	Val	Arg	Leu	Glu	Lys	Leu	Val	Asn		
	465				470					475					480		
Cys	Trp	Pro	Glu	Gln	Lys	Leu	Lys	Gly	Ser								
				485					490								

```
<210> 3
<211> 22
<212> ADN
<213> Escherichia coli
```

<223> Gène LacZ.

<400> 3
tggagtgcacg gcagttatct gg 22

```
<210> 4
<211> 22
<212> ADN
<213> Escherichia coli
```

<220>
<223> Gène LacZ.

<400> 4
 qqcttcatcc accacataca gg 22

```
<210> 5
<211> 25
<212> ADN
<213> Escherichia coli
```

<220>
<223> Gène LacZ.

<400> 5
ccgtgcacat gccagtttga gggga 25

```
<210> 6
<211> 44
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
```

<223> Description de la séquence artificielle:Adaptateur
amorce synthétique.

<400> 6
ctaatacgcac tcactatagg gctcgcgcgg ccgccccggc aggt 44

<210> 7
<211> 27

<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Amorce synthétique

<400> 7
ccatcctaatacgaactcactatagggc

27

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Escherichia coli

<220>
<223> Gène LacZ.

<400> 8
gggatccgccatgtcacaga

20

<210> 9
<211> 44
<212> ADN
<213> Poulet

<220>
<223> Amorce.

<400> 9
actatcgattctggaaccttcagagggttttttttttttttttt

44

<210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> Poulet

<220>
<223> Amorce.

<400> 10
gtcgtgcaacgggactgcctg

21

<210> 11
<211> 25
<212> ADN
<213> Poulet

<220>
<223> Amorce.

<400> 11
ctatcgattctggaaccttcagagg

25

<210> 12
<211> 171

<212> ADN
<213> Poulet

<400> 12
tccttctcta cggaccgttt gctgacggac ttccctgggc ctgctacctg agacctgctg 60
cttctccct gacctgcacc ctctcgttgc ccaagaccgg cctcactgct cctgcccttc 120
ggcctoggac catcggaacg togtgcaacg ggactgctgc tgaatcctgg t 171

<210> 13
<211> 18
<212> ADN
<213> Poulet

<220>
<223> Amorce.

<400> 13
agaccggcct cactgctc 18

<210> 14
<211> 21
<212> ADN
<213> Poulet

<220>
<223> Amorce ens1 S1

<400> 14
ggatctagat cctcaaata a 21

<210> 15
<211> 19
<212> ADN
<213> Poulet

<220>
<223> Amorce ens1 AS1

<400> 15
aattcttggg caacctctc 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01207

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! accession: AJ393785, 19 February 2000 (2000-02-19) BUERSTEDDE J M ET AL: "Gallus gallus EST clone 16n24r1" XP002164731 cited in the application 93.2% d'identité dans un chevauchement de 752 paires de bases avec SEQ ID NO 1</p>	1,6,7
T	<p>ACLOQUE HERVE ET AL: "Identification of a new gene family specifically expressed in chicken embryonic stem cells and early embryo." MECHANISMS OF DEVELOPMENT, vol. 103, no. 1-2, May 2001 (2001-05), pages 79-91, XP001015571 ISSN: 0925-4773 the whole document</p>	1-45
P,X	<p>-& DATABASE EMBL 'Online! accession: AF327879, 12 February 2001 (2001-02-12) ACLOQUE H ET AL: "Gallus gallus ENS-1 (ens-1) mRNA, complete cds." XP002173838 99.8% d'identité dans un chevauchement de 3970 paires de bases avec SEQ ID NO 1 99.6% d'identité dans un chevauchement de 490 acides aminés avec SEQ ID NO 2</p>	1-7
A	<p>WO 00 12683 A (UNIV NEW YORK) 9 March 2000 (2000-03-09)</p>	
A	<p>PAIN B ET AL: "Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities." DEVELOPMENT (CAMBRIDGE), vol. 122, no. 8, 1996, pages 2339-2348, XP002164729 ISSN: 0950-1991 cited in the application</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/01207

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0012683 A	09-03-2000	AU 5696799 A EP 1117765 A	21-03-2000 25-07-2001

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 01/01207

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE					
CIB 7	C12N15/12	G01N33/68	A01K67/027	C07K14/465	C07K16/18
	A61K39/395	A61K31/7088	A61K38/17	C12N5/10	C12N15/63
	C12Q1/68				
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB					
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE					
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)					
CIB 7	C12N	A01K	C12Q	G01N	C07K A61K
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche					
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)					
EMBL, STRAND, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data					
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS					
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents				no. des revendications visées
X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! accession: AJ397754, 19 février 2000 (2000-02-19) BUERSTEDDE J M ET AL: "Gallus gallus EST clone 30n22r1" XP002164730 cité dans la demande 97.6% d'identité dans un chevauchement de 619 paires de bases avec SEQ ID NO 1 94.7% d'identité dans un chevauchement de 190 acides aminés avec SEQ ID NO 2 (tfasta)</p> <p style="text-align: center;">— — — — — — / —</p>				1,4,6,7
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe					
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "U" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets					
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée			Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale		
2 août 2001			17/08/2001		
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale			Fonctionnaire autorisé		
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016			Devijver, K		

Formulaire PCTISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 01/01207

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! accession: AJ393785, 19 février 2000 (2000-02-19) BUERSTEDDE J M ET AL: "Gallus gallus EST clone 16n24r1" XP002164731 cité dans la demande 93.2% d'identité dans un chevauchement de 752 paires de bases avec SEQ ID NO 1</p>	1,6,7
T	<p>ACLOQUE HERVE ET AL: "Identification of a new gene family specifically expressed in chicken embryonic stem cells and early embryo." MECHANISMS OF DEVELOPMENT, vol. 103, no. 1-2, mai 2001 (2001-05), pages 79-91, XP001015571 ISSN: 0925-4773 le document en entier</p>	1-45
P,X	<p>-& DATABASE EMBL 'en ligne! accession: AF327879, 12 février 2001 (2001-02-12) ACLOQUE H ET AL: "Gallus gallus ENS-1 (ens-1) mRNA, complete cds." XP002173838 99.8% d'identité dans un chevauchement de 3970 paires de bases avec SEQ ID NO 1 99.6% d'identité dans un chevauchement de 490 acides aminés avec SEQ ID NO 2</p>	1-7
A	<p>WO 00 12683 A (UNIV NEW YORK) 9 mars 2000 (2000-03-09)</p>	
A	<p>PAIN B ET AL: "Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities." DEVELOPMENT (CAMBRIDGE), vol. 122, no. 8, 1996, pages 2339-2348, XP002164729 ISSN: 0950-1991 cité dans la demande</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 01/01207

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0012683 A	09-03-2000	AU 5696799 A EP 1117765 A	21-03-2000 25-07-2001

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUS SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 43,44(f)

Les revendications 43 et 44(f) présentes ont trait à une très grande variété de composés et de produits, non-divulgués au sens de l'Article 6 PCT et/ou au sens de l'Article 5 PCT (substance ou milieu capables d'induire une différenciation de cellules pluripotentes; substance capable de restaurer le caractère pluripotent de cellules différenciées). Dans le cas présent, une recherche significative est impossible pour les revendications 43 et 44(f).

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 01/01207

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 G01N33/68 A01K67/027 C07K14/465 C07K16/18
 A61K39/395 A61K31/7088 A61K38/17 C12N5/10 C12N15/63
 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A01K C12Q G01N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EMBL, STRAND, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! accession: AJ397754, 19 February 2000 (2000-02-19) BUERSTEDDE J M ET AL: "Gallus gallus EST clone 30n22r1" XP002164730 cited in the application 97.6% d'identité dans un chevauchement de 619 paires de bases avec SEQ ID NO 1 94.7% d'identité dans un chevauchement de 190 acides aminés avec SEQ ID NO 2 (tfasta)</p> <p style="text-align: center;">— -/-</p>	1,4,6,7

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 August 2001

Date of mailing of the international search report

17/08/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Devijver, K